ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN ISOLIERTEN UND KULTIVIERTEN VORHOFZELLEN DES MEERSCHWEINCHENHERZENS

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

MARTIN BECHEM

Bochum 1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547222_0046

ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

AN ISOLIERTEN UND KULTIVIERTEN

VORHOFZELLEN DES MEERSCHWEINCHENHERZENS

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Martin Bechem

Bochum 1983

Herrn Prof. Dr. H. G. Glitsch und Herrn Dr. L. Pott gilt mein besonderer Dank für die zahlreichen, anregenden Diskussionen bei der Anfertigung dieser Arbeit.
Herrn Dipl.-Phys. C. Methfessel danke ich für die Überlassung seiner Auswerteprogramme.
Die technische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente durch Frau U. Müller und Herrn H. Rennebaum möchte ich dankbar würdigen.

Die Untersuchungen dieser Arbeit entstanden mit finanzieller Unterstützung durch den Minister für Wissenschaft und Forschung des Landes NRW (AZ IV B 5/FA 8833).

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. Einleitung
1. Grundlagen der Herzelektrophysiologie 1
2. Ionenbewegungen durch die Membran 4
3. Isolierung adulter Herzzellen 10
4. Nachweis und Messung einzelner Ionenkanäle 14

II. Methodik 18

III. Ergebnisse
1. Die Isolierung und Kultivierung von adulten Vorhofzellen 39
2. Elektrophysiologische Eigenschaften der frisch isolierten Zellen 45
3. K-Ströme in kultivierten Vorhofzellen 55
4. K-Kanäle in der CAP-Ableitung 64
5. Charakterisierung eines K-Kanals in der OSOP-Ableitung
a. Selektivität und Leitfähigkeit 73
b. Kinetische Eigenschaften des Kanals 81
c. Rekonstruierte steady-state Stromspannungsbeziehung 86
d. Blockierung durch Barium-Ionen 88

IV. Diskussion 105

V. Zusammenfassung 125

VI. Liste der Abkürzungen 128

VII. Literaturverzeichnis 130

I. EINLEITUNG

1. Grundlagen der Herzelektrophysiologie

Die Herzmuskelzelle besitzt wie andere elektrisch erregbare Zellen unter physiologischen Bedingungen eine Membranspannung, die als ein wichtiger Faktor an der Kontrolle der physiologischen Aktivität der Zellen beteiligt ist. So wird die geordnete Kontraktion der Herzmuskelzellen, eine notwendige Voraussetzung für die Funktion des Herzens, durch die Membranspannung der Zellen gesteuert. Auch die nervösen Einflüsse des vegetativen Nervensystems, die für eine Anpassung der Herztätigkeit an die Erfordernisse des Körpers sorgen, werden zum Teil über eine Veränderung der Zellmembranspannung vermittelt.

Seit der Einführung der Mikroelektrodentechnik von Ling & Gerard (1949) ist es möglich, auch die Membranspannung von kleinen Zellen direkt und exakt zu messen. Dabei wird eine fein ausgezogene Glaskapillare mit einem Spitzendurchmesser von ca. 0,1 - 1 µm, die mit einer Elektrolytlösung gefüllt ist, in das Innere einer Zelle eingestochen und die Spannung gegenüber der umgebenden Badlösung gemessen. Weidmann (1951) konnte mit dieser Methode eine erste Messung der Membranspannung sowie der elektrischen Membraneigenschaften der Herzmuskelzelle durchführen. Damit war der Anstoß gegeben, das Zustandekommen der Zellmembranspannung und die Möglichkeiten einer Beeinflussung an verschiedenen Herzpräparaten intensiv zu untersuchen (vgl. Sperelakis, 1979).

Unter Ruhebedingungen weist das Zellinnere eine Membranspannung, das Ruhepotential (R_p), von ca. -80 mV bei Ventrikel-, Vorhof- und Purkinjezellen und ca. -50 mV bei Sinus- und Atrioventrikularknotenzellen (AV-Zellen) auf. Das Ruhepotential kommt durch die unsymmetrische Verteilung von Na-, K-, Ca- und Cl-Ionen im extra- und intrazellulären Raum sowie durch spezifische Membranpermeabilitäten für diese Ionen zustande. Unter

Ruhebedingungen ist die Permeabilität der Membran für K-Ionen (P_K) viel größer als die der übrigen Ionen, so daß das Ruhepotential in erster Näherung vom Kaliumgleichgewichtspotential (E_K) bestimmt wird. Die Gleichgewichtspotentiale der verschiedenen Ionen lassen sich mit Hilfe der Nernst'schen Gleichung berechnen.

Das berechnete Kaliumgleichgewichtspotential ist jedoch immer negativer als das gemessene Ruhepotential (Weidmann, 1974). Dies resultiert aus einer geringen aber nicht zu vernachlässigenden Permeabilität der Membran für andere Ionen, insbesondere Na-Ionen. Unter der Annahme der "Constant-field"-Hypothese von Goldmann und Hodgkin & Katz (vgl. Hodgkin & Katz, 1949) kann das Ruhepotential bei passiver Anionenverteilung durch die Goldmanngleichung beschrieben werden:

$$R_P = \frac{R\,T}{F} \ln \frac{K_o + a\,Na_o}{K_i + a\,Na_i} \qquad (1)$$

$$\text{mit } a = P_{Na}/P_K$$

P_K, P_{Na} sind die Permeabilitäten für Na bzw. K-Ionen; R, T und F haben ihre übliche thermodynamische Bedeutung; K_o (Na_o) sind die extrazellulären und K_i (Na_i) die intrazellulären Konzentrationen der entsprechenden Ionen.

Legt man die von Glitsch et al. (1976) angegebenen Konzentrationen zugrunde, so ergibt sich am Meerschweinchenvorhof bei einem Ruhepotential von -72 mV ein Permeabilitätsverhältnis a = 0,02. Auch an anderen Herzpräparaten wurden vergleichbare Werte bestimmt (u.a. Froschvorhof: 0,012, Haas et al., 1966; Schafspurkinjefaser: 0,018, Scheu et al., 1980). Eine Ausnahme bilden hierbei offensichtlich die zur Spontanaktivität befähigten Zellen des Atrioventrikular- und Sinusknotens sowie embryonale Herzmuskelzellen, die ein relativ niedriges Ruhepotential mit einem hohen Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_K besitzen (Weidmann, 1974; Irisawa, 1978; Sperelakis, 1979).

Wird die Zellmembran einer elektrisch erregbaren Zelle kurzzeitig durch einen Strompuls depolarisiert, so kommt es bei Überschreiten der Schwellenspannung zu einer nahezu sprunghaften Veränderung der Membranspannung auf ca. +40 mV. Die Umkehrung der Membranspannung hält nur kurze Zeit an und bildet sich anschließend mit charakteristischem zeitlichen Verlauf wieder zurück. Diese Veränderung des Membranpotentials, das Aktionspotential, wird über die gesamte Zelle und am Herzen durch die elektrische Kopplung der Einzelzellen im Gewebe fortgeleitet. Das Herzaktionspotential unterscheidet sich von denen der Nerven- und Skelettmuskelzellen durch die längere Dauer und die ausgeprägte Plateauphase (Übersicht: Carmeliet & Vereecke, 1979).

Die schnelle Aufstrichsphase des Aktionspotentials wird im wesentlichen durch die Zunahme der Membranleitfähigkeit für Na-Ionen hervorgerufen. Während der schnelle Na-Einstrom schon nach wenigen ms wieder inaktiviert, wird eine schnelle Repolarisation im Bereich der Plateauphase des Herzaktionspotentials durch einen weiteren Einwärtsstrom, den sogenannten langsamen Einwärtsstrom (I_{si}), verhindert. Dieser Strom kommt in erster Linie durch eine Leitfähigkeitserhöhung für Ca-Ionen zustande. Eine zeitabhängige Inaktivierung des langsamen Einstroms sowie eine verzögerte Aktivierung auswärtsgerichteter K-Ströme lösen schließlich nach mehr als 100 ms die Repolarisation aus.

An spontanaktiven Zellen des Sinus- und AV-Knotens sowie der ventrikulären Erregungsleitungsbahnen kommt es nicht zur Ausprägung eines stabilen Ruhepotentials, es wird vielmehr eine langsame, diastolische Depolarisation beobachtet, die beim Erreichen der Schwellenspannung ein Aktionspotential auslöst (vgl. Brown, 1982). Bei der Erregungsausbreitung am Herzen in situ übernimmt der Sinusknoten als Bereich mit der höchsten Spontanfrequenz die Funktion eines Schrittmachers für das gesamte Herz. Andere zur Spontanaktivität befähigte Gewebe haben eine geringere Depolarisationsgeschwindigkeit in der Diastole und werden vor Erreichen der Schwellenspannung durch das vom

Sinusknoten fortgeleitete Aktionspotential getriggert. Die geordnete Ausbreitung der Erregung, beginnend im Sinusknoten über die Vorhöfe zum AV-Knoten und schließlich über das Erregungsleitungssystem zu den Kammern, ist eine wichtige Voraussetzung für die Kontraktionstätigkeit des Herzens (vgl. Noble, 1975). Durch den Einfluß des vegetativen Nervensystems kann die Frequenz und Dauer der Aktionspotentiale verändert und damit die Herzleistung an die Erfordernisse des Kreislaufs angepaßt werden.

Das Aktionspotential führt über den Ca-Einstrom zur Auslösung der Muskelkontraktion. Dieser Vorgang, die elektromechanische Kopplung, wird hauptsächlich durch einen Anstieg der intrazellulären, freien Ca-Konzentration (Ca_i) vermittelt, die eine Aktivierung der kontraktilen Filamente der Muskelzelle bewirkt.

Zur Aufrechterhaltung der Ionengradienten über der Membran, die eine wesentliche Voraussetzung für das Zustandekommen der Membranspannung darstellen, verfügen Zellen über aktive Transportmechanismen. Der Na-K-Austausch sorgt unter Aufwendung von Stoffwechselenergie für konstante ionale Konzentrationen bezüglich der Hauptkationen Na und K (Übersichten: Glitsch, 1979; Sperelakis, 1979). Da der Na-Auswärtstransport den K-Einwärtstransport übersteigt, liefert der Na-K-Austausch einen Netto-Auswärtsstrom (elektrogener Transport), der in unterschiedlichem Maß zur Stabilisierung des Ruhepotentials selbst beitragen kann (Glitsch, 1969, 1973). Der Ca-Na-Austauschmechanismus hält zusammen mit anderen Speicher- und Transportvorgängen die freie intrazelluläre Ca-Konzentration in Ruhe auf weniger als 10^{-7} M. Wegen ihrer wichtigen Funktion bei der elektromechanischen Kopplung unterliegt die intrazelluläre Ca-Konzentration einer besonders empfindlichen und wirksamen Kontrolle (Übersicht: Chapman, 1979).

2. Ionenbewegungen durch die Membran

Die Zellmembran ist nicht nur für das Zustandekommen von Ruhe- und Aktionspotential verantwortlich, sondern sie trägt auch die wichtigsten Regulationsmechanismen für die Zusammensetzung der intrazellulären Flüssigkeit. Der Zellmembran kommt

daher bei der Steuerung der gesamten physiologischen Aktivität der Zellen und des Gewebes eine hohe Bedeutung zu.

Die Elektrophysiologie beschäftigt sich mit einem Teilaspekt des membranalen Transportes, der Bewegung von Ionen durch die Membran und ihren physiologischen Auswirkungen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die ionalen Flüsse zu bestimmen. Eine Möglichkeit besteht in der Messung der Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran; aus der zeitlichen Veränderung können dann die Durchtrittsraten ermittelt werden. Insbesondere der intrazelluläre Raum ist jedoch bei den meisten Präparaten einer direkten Messung nur schwer zugänglich (eine Ausnahme bildet hierbei das Tintenfisch-Riesenaxon, vgl. Hodgkin & Keynes, 1955 a, b).

Die Einführung der radioaktiven Fluxmessung überwand diese Schwierigkeit und gestattete selbst bei kleinen Zellen, wie z. B. den Herzzellen, die Bestimmung der ionalen Fluxe, indem die Abgabe von Isotopen aus einem vorher bis zum Gleichgewicht aufgeladenen Präparat verfolgt wird (u. a. Haas & Glitsch, 1962; Haas et al., 1966). Eine ausreichend genaue Bestimmung intrazellulärer Ionenaktivitäten in kleinen Zellen ist jedoch erst mit ionensensitiven Mikroelektroden möglich geworden (Thomas, 1978; Lee, 1981). Die genannten Methoden haben den Nachteil, daß sie bezüglich der zeitlichen Auflösung stark begrenzt sind, d.h. schnelle ionale Bewegungen, wie sie etwa beim Aktionspotential auftreten, entziehen sich der direkten Beobachtung. Ihr Vorteil liegt in der hohen Spezifität bei der Unterscheidung zwischen verschiedenen Ionenarten.

Ionenbewegungen durch die Membran können auch mit Hilfe der von Hodgkin, Huxley & Katz (1949) erstmals beschriebenen Methode der Spannungsklemme (voltage-clamp) direkt gemessen werden. Diese Methode erlaubt die Messung der ionalen Membranströme bei konstantgehaltener Membranspannung. Die wechselseitige Beeinflussung von Strom und Spannung, wie sie normalerweise beim Aktionspotential vorkommt, wird damit aufgehoben, und die Spannungs- und Zeitabhängigkeit der Membran-

ströme kann unmittelbar bestimmt werden. Der Hauptvorteil dieser Technik liegt in der Erfassung sehr schneller, kinetischer Eigenschaften des Ionentransportes, wie sie beispielsweise beim Aktionspotential auftreten. Als prinzipieller Nachteil muß angemerkt werden, daß eine Identifizierung der am Strom beteiligten Ionen nur indirekt möglich ist und in vielen Fällen keinen eindeutigen Befund erbringt.

Anders als am Tintenfischriesenaxon, an dem Hodgkin & Huxley (1952 a-d) eine vollständige Analyse der Membranströme durchführten, zeigten sich an Herzpräparaten eine ganze Reihe von Schwierigkeiten bei der Durchführung von Untersuchungen mit der Spannungsklemme. Sowohl das Verfahren der doppelten Saccharose-Trennwand (Rougier et al., 1968) als auch die Zwei-Mikroelektroden-Methode (Deck et al., 1964) wurden in ihrer Anwendbarkeit durch das komplex aufgebaute Herzgewebe eingeschränkt. Zusätzlich sind die gemessenen Ströme am Herzmuskel durch die Überlagerung verschiedener Komponenten komplizierter als an Nerven- und Muskelfasern. Trotz dieser Einschränkungen hat die Technik der Spannungsklemme am Herzen in fast zwei Jahrzehnten einen wichtigen und grundlegenden Beitrag zur Aufklärung der Erregungsprozesse geliefert (Übersichten: Coraboeuf, 1978; Carmeliet & Vereecke, 1979).

Neben dem schnellen Na-Einstrom und dem langsamen Ca-Einstrom treten an verschiedenen Herzpräparaten eine Reihe von K-Strömen in Erscheinung, die aufgrund ihrer Spannungs- und Zeitabhängigkeit nach Spannungssprüngen klassifiziert werden. Der Hintergrundkaliumstrom (I_{K1}, K_{bg}) erreicht per Definition unmittelbar nach einem Spannungssprung einen neuen Gleichgewichtswert, während zeitabhängige Ströme (I_{K2}, I_{x1}, I_{x2} am Purkinjefaden, I_K, I_x am Ventrikel und I_f bzw. I_h am Sinusknoten) nach Spannungssprüngen mit bestimmten Zeitkonstanten aktivieren oder inaktivieren.

Ein gemeinsames Merkmal vieler K-Ströme und insbesondere der Hintergrundströme ist die Einwärtsgleichrichtung, eine Eigenschaft, die zum ersten Mal von Katz (1949) an der Skelettmuskelfaser beobachtet wurde. In isotonischen K-Sulfat-

lösungen konnte er für Einwärtsströme einen geringeren Widerstand als für Auswärtsströme messen. Später haben sich verschiedene Autoren mit der Einwärtsgleichrichtung beschäftigt und Erklärungsmöglichkeiten vorgeschlagen (Hodgkin & Horowicz, 1959; Adrian & Freygang, 1962 a, b; Almers, 1972). Auch die K-Ströme anderer Präparate weisen ähnliche Eigenschaften auf (z. B. Motorneurone der Katze: Nelson & Frank, 1967; Seesterneier: Hagiwara & Takahashi, 1974). Von den meisten Autoren wird dabei angenommen, daß die K-Leitfähigkeit der Zellmembran nicht von der Membranspannung, sondern vielmehr von der treibenden Kraft $V-E_K$ (V stellt die jeweilige Membranspannung dar) des K-Stroms abhängt. Die Leitfähigkeit ist hoch, wenn die Differenz negativ ist, und gering bei positiver treibender Kraft. Leech und Stanfield (1981) haben jedoch kürzlich eine Untersuchung veröffentlicht, in der sie diese Vorstellung in Zweifel ziehen und die K-Leitfähigkeit als Funktion der Membranspannung und der extrazellulären K-Konzentration (K_o) beschreiben.

Im Unterschied zur ursprünglichen Bedeutung versteht man in der Herzelektrophysiologie unter Einwärtsgleichrichtung eine Zunahme des Membranwiderstands bei einer Depolarisation, auch wenn dabei keine Umkehrung der Stromrichtung erfolgt. Insbesondere die steady-state Stromspannungsbeziehungen, bei denen der Membranstrom gemessen nach Abklingen aller zeitabhängigen Ströme gegen die jeweilige Klemmspannung aufgetragen wird, weisen am Herzen die typischen Merkmale der Einwärtsgleichrichtung auf (u. a. McAllister & Noble, 1966; Carmeliet, 1982). Am Purkinjefaden kommt es dabei unter bestimmten Bedingungen zur Ausprägung eines N-förmigen Kurvenverlaufs mit einer Region negativen Widerstands und mehreren Nulldurchgängen. Nulldurchgänge mit positivem Widerstand markieren die verschiedenen möglichen Ruhepotentiale unter den gegebenen Bedingungen. Der typische Verlauf der Stromspannungskurve kann durch den Vergleich mit parallel durchgeführten Fluxmessungen auf die Spannungsabhängigkeit der K-Leitfähigkeit bezogen werden (Vereecke et al., 1980).

Steady-state Stromspannungsbeziehungen am Vorhof- und Sinuspräparat weisen grundsätzlich ähnliche Charakteristika auf, ihnen fehlt jedoch der Bereich negativen Widerstands (u. a. Brown & Noble, 1969; Seyama, 1976). Die Kurven haben einen sigmoiden Verlauf mit einem Bereich hohen Widerstands bei Membranspannungen von -70 bis -10 mV.

Bei depolarisierenden Spannungssprüngen kommt es am Herzen wie auch bei anderen elektrisch erregbaren Zellen zur Aktivierung eines K-Auswärtsstroms, der bei Repolarisation wieder inaktiviert (McAllister & Noble, 1966; Noble & Tsien, 1969; Brown et al., 1976 a; Noma & Irisawa, 1976; McDonald & Trautwein, 1978). Aufgrund ihrer verzögerten Aktivierung und ihrer Gleichrichtungseigenschaft bezeichnet man diese Ströme als verzögerte, einwärtsgleichrichtende K-Ströme. Die verzögerte Aktivierung der K-Auswärtsströme mit Zeitkonstanten von mehr als 100 ms ist eine der Ursachen für die längere Aktionspotentialdauer am Herzen im Vergleich zu Nerv- und Skelettmuskelfasern. Je nach dem zeitlichen Verlauf der Aktivierung und Inaktivierung sowie der Potentialabhängigkeit werden von den verschiedenen Autoren weitere Unterscheidungen einzelner Stromsysteme vorgenommen (Noble & Tsien, 1969; Brown et al., 1976 b). Da es sich bei diesen K-Strömen zum Teil um Präparat-spezifische Ströme handelt, ist eine vergleichende Charakterisierung mit Schwierigkeiten verbunden und eine Übertragung der Befunde beispielsweise vom Purkinjefaden auf den Vorhof nicht möglich.

Eine besondere Rolle unter den K-Strömen des Herzens nimmt der "Schrittmacherstrom" (I_{K2}) ein, der, wie der Name sagt, mit der Spontanaktivität des Herzens in Zusammenhang gebracht wird. Noble & Tsien (1968) beobachteten am Purkinjefaden bei langanhaltenden Spannungssprüngen auf Werte negativer als das Ruhepotential nach Depolarisationen eine zeitliche Veränderung des Klemmstroms. Sie interpretierten den Stromverlauf als Inaktivierung eines Auswärtsstroms, der unter physiologischen Bedingungen die diastolische Depolarisation hervorrufen könnte. Ähnliche Ströme wurden auch an anderen zur Spontanaktivität be-

fähigten Herzpräparaten beschrieben (Noma & Irisawa, 1976 I_p; DiFrancesco & Ojeda, 1980 I_f und Yanagihara & Irisawa, 1980 I_h). Aufgrund der Interpretation von Noble & Tsien wurde lange Zeit angenommen, daß es sich bei dem Schrittmacherstrom um einen echten K-Strom handelt. Im Gegensatz hierzu kommt DiFrancesco (1981 a, b; siehe auch DiFrancesco & Ojeda, 1980) zu einer vollkommen anderen Interpretation der Messungen; er betrachtet den bei Hyperpolarisationen auftretenden Strom als einen aktivierenden Einwärtsstrom. Mit dieser neuen Interpretation scheiden K-Ionen als Ladungsträger aus, da K-Ströme bei Membranspannungen positiver als E_K auswärtsgerichtet sind. Die ionale Natur des Schrittmacherstroms ist daher weitgehend ungeklärt.

Der parasympathische Einfluß auf das Herz wird am Vorhof, Sinus- und AV-Knoten durch die Freisetzung des Transmitters Acetylcholin (ACh) aus den Nervenendigungen des Vagus vermittelt. ACh bewirkt über den muskarinergen Rezeptor an diesen Präparaten eine Erhöhung der Membranleitfähigkeit für K-Ionen (Harris & Hutter, 1956; Trautwein & Dudel, 1958; Glitsch & Pott, 1978). Der durch ACh ausgelöste K-Strom besitzt Merkmale, die auch an anderen K-Strömen beobachtet wurden. So weist die Stromspannungsbeziehung Einwärtsgleichrichtung auf und zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der extrazellulären K-Konzentration (z. B. Noma & Trautwein, 1978). Die ACh-Wirkung wurde daher auf eine Zunahme des K-Hintergrundstroms (I_{K1}) zurückgeführt (Garnier et al., 1978; Ojeda et al., 1981). Im Gegensatz hierzu kommen Trautwein und Mitarbeiter aufgrund ihrer Untersuchungen zu dem Schluß, daß durch ACh eine separate K-Leitfähigkeit induziert wird (Noma & Trautwein, 1978; Noma et al., 1979 a, b; Osterrieder et al., 1980).

Die Vielfalt der K-Ströme am Herzen hat bisher die intensive Untersuchung einzelner Stromsysteme erschwert oder gar verhindert. So haben besonders die Arbeiten von DiFrancesco gezeigt, mit welchen Schwierigkeiten eine eindeutige Interpretation der Messungen mit der Spannungsklemme am Herzen verbunden sein kann. Insbesondere die Messung des Umkehr-

potentials, normalerweise ein eindeutiger Hinweis auf die ladungstragenden Ionen, kann bei Veränderungen der extrazellulären Ionenkonzentrationen durch Akkumulations- und Depletionsvorgänge, wie sie am Herzen beobachtet wurden (Noble, 1976; Baumgarten & Isenberg, 1977), zu Fehlinterpretationen führen. Da bisher auch keine hochspezifischen Blocker zur Verfügung stehen, die eine zuverlässige Unterscheidung verschiedener K-Ströme ermöglichen, scheinen konventionelle Stromspannungsuntersuchungen an eine Grenze gestoßen zu sein.

Die Beseitigung eines Teiles der experimentiellen Beschränkungen erscheint durch die Verwendung von Einzelzellen als Untersuchungsobjekte möglich. Im Unterschied zum multizellulären Präparat sollten bei Einzelzellen die Spannungskontrolle der Zellmembran verbessert und eine Veränderung der ionalen Konzentrationen durch Akkumulation und Depletion verringert sein.

3. Isolierung adulter Herzzellen

Die Herzmuskulatur ist aus einzelnen, komplex miteinander vernetzten Herzzellen aufgebaut, die in eine Struktur aus Bindegewebe eingelagert sind (McNutt & Fawcett, 1969; Radivoj, 1978). Die einzelnen Herzzellen sind sowohl elektrisch (elektrotonische Kopplung) als auch mechanisch über die Glanzstreifen miteinander verbunden. Die Verbindungsstellen zwischen den Zellen weisen einen geringen elektrischen Widerstand auf und erlauben die Diffusion kleiner Moleküle. Bei einer Verletzung des Herzgewebes kommt es zu einem Verschließen dieser Verbindungsstellen in den Randgebieten, so daß die übrigen Zellen nicht dauerhaft depolarisiert werden. Dieser Vorgang ist von der Konzentration zweiwertiger Kationen und insbesondere von Ca-Ionen abhängig (De Mello, 1975). Sowohl eine Erhöhung der intrazellulären Ca-Konzentration als auch eine Absenkung der extrazellulären Ca-Konzentration können zur elektrischen Entkopplung der Zellen führen (vgl. Muir, 1967).

Letztere Beobachtung hat man sich seit etwa zehn Jahren zunutze gemacht, um einzelne Herzzellen vom adulten, ausdifferenzierten Herzen zu isolieren (Berry et al., 1970; Vahouny et al., 1970; Gould & Powell, 1972; Glick et al., 1974). Im Unterschied zu embryonalen Zellen, die relativ einfach isoliert werden können und daher auch schon seit längerem in der Zellkultur Verwendung finden (vgl. z. B. Lehmkul & Sperelakis, 1963), muß beim adulten Gewebe erst das wesentlich stärker ausgeprägte Bindegewebe abgebaut werden, um die Zellen freizusetzen. Dies wird durch die Verwendung verschiedender, proteolytischer Enzyme, wie Collagenase und unspezifische Protease, erreicht.

Übereinstimmend weisen die verschiedenen Isolierungsmethoden folgendes Prinzip auf: 1. die Zellen werden durch eine Ca-freie Lösung elektrisch entkoppelt; 2. das Bindegewebe wird durch geeignete Enzyme abgebaut; 3. die Zellen werden gereinigt und wieder in physiologische Lösungen überführt. Dabei wird die höchste Ausbeute intakter Zellen erzielt, wenn das Herz während der Isolierung bis zum Auflösen des Gewebeverbandes kontinuierlich mit den benötigten Lösungen retrogard, d. h. über die Koronarien, entsprechend einer Langendorff-Perfusion durchströmt wird (Berry et al., 1970; Powell & Twist, 1976; Powell et al., 1980). Auch eine Inkubation von Gewebestücken in den entsprechenden Lösungen ist grundsätzlich möglich, erbringt jedoch eine geringere Ausbeute (Vahouny et al., 1970; Glick et al., 1974; Isenberg & Klöckner, 1980).

Als besonders kritisch hat sich der dritte Schritt der Zellisolierung, die Überführung der Zellen in physiologische Lösungen mit einer normalen Ca-Konzentration (Ca_o), erwiesen (Nag et al., 1977, Altschuld et al., 1980; Russo et al., 1981; Isenberg & Klöckner, 1982a). Schon Zimmermann & Hülsmann (1966) hatten beobachtet, daß beim isolierten Herzen nach einer Perfusion mit Ca-freien Lösungen die Wiedereinführung der physiologischen Ca_o zu einer irreversiblen Schädigung der Zellen führt. Sie hatten diesen Vorgang als Ca-Paradox bezeichnet. Dabei reagierten die Herzzellen auf die Ca_o-Erhöhung mit einer erhöhten Membranpermeabilität, dem Verlust intrazellulärer Enzyme sowie einer Hyperkontraktur, die schließlich den Zelltod hervorruft.

Ähnliche Vorgänge können auch an isolierten Zellen bei einer Ca_o-Erhöhung beobachtet werden. Es hat die verschiedensten Ansätze gegeben, das Ca-Paradox zu überwinden und Ca-tolerante Zellen zu isolieren. Die Begrenzung der Ca-freien Inkubation des Herzens auf eine möglichst kurze Zeit (ca. 5 Minuten) und die Erhöhung der Ca_o während der enzymatischen Behandlung auf ca. 20-30 µM haben die Ausbeute intakter Zellen erhöht (Powell et al., 1980). Zusätzlich bevorzugen Isenberg & Klöckner (1982a) die Inkubation der isolierten Zellen in einer "Kraftbrühe", die aus einer hoch K-haltigen Lösung mit zusätzlichen Aminosäuren und ATP besteht. Demgegenüber haben Altschuld et al. (1980) dargestellt, daß bei vorsichtiger Behandlung der Zellen eine kurzzeitige Erwärmung auf ca. 30-34° C vor der Inkubation mit physiologischen Lösungen ausreicht, um Ca-Toleranz zu induzieren. Eine abschließende Bewertung der Zweckmäßigkeit der verschiedenen Methoden steht jedoch zur Zeit noch aus.

Die frisch isolierten Ventrikelzellen haben eine rechteckige Gestalt mit deutlich sichtbarer Querstreifung. Sie können von toten, geschädigten Zellen durch den Ausschluß von Farbstoffen und durch die Auslösung sichtbarer Kontraktionen bei Feldstimulation unterschieden werden.

Elektrophysiologische Untersuchungen an Einzelzellen wurden erst mit der Isolierung Ca-toleranter Zellen möglich. Die Untersuchungen haben gezeigt, daß die isolierten Zellen unter sorgfältig gewählten Bedingungen gut für elektrophysiologische Experimente geeignet sind und sich in ihren elektrischen Eigenschaften nicht wesentlich von Gewebepräparaten unterscheiden (Isenberg & Klöckner, 1980, 1982 a-c; Powell et al., 1980).

Als nachteilig erwies sich, daß das Einstechen konventioneller Mikroelektroden in Einzelzellen mit erhöhten Schwierigkeiten verbunden ist und in den meisten Fällen zur augenblicklichen Zerstörung der Zelle führt (vgl. Powell et al., 1980). Diese Schwierigkeit konnte durch die Verwendung niederohmiger Saugelektroden überwunden werden (Lee et al., 1980; Undrovinas et al., 1980; Brown et al., 1981 a, b; Bodewei et al., 1982).

Im Unterschied zu herkömmlichen Mikroelektroden besitzen die Saugelektroden einen wesentlich größeren Spitzendurchmesser (von ca. 10-20 µm). Die Spitze der Elektrode wird durch eine spezielle Behandlung geglättet und mit einem hydrophoben Oberflächenfilm überzogen, so daß beim Aufsetzen einer solchen Elektrode auf die Zellmembran durch Anlegen eines leichten Unterdrucks ein Abdichtwiderstand von einigen hundert MΩ erzielt werden kann. Nach der Zerstörung der Membran unter der Pipettenöffnung besteht ein niederohmiger Zugang zum Zellinneren. Es ist daher möglich, mit der Saugelektrode sowohl Spannungs- als auch Strommessungen bei geklemmter Membranspannung durchzuführen.

Eine andere Besonderheit beim Arbeiten mit Einzelzellen ergibt sich aus ihrem relativ geringen Volumen. Selbst bei der Ableitung mit herkömmlichen, hochohmigen Mikroelektroden wird die intrazelluläre Lösung mit der Zeit gegen die Elektrodenlösung ausgetauscht, wobei die Dauer dieses Vorganges weitgehend vom Durchmesser der Elektrodenöffnung abhängig ist. Bei Experimenten kann daher neben der extrazellulären auch die intrazelluläre Lösung in bezug auf ihre Zusammensetzung kontrolliert und verändert werden (Brown et al., 1981 a, b; Osterrieder et al., 1982a; Irisawa & Kokubun, 1983).

Die bisher veröffentlichten Untersuchungen beschäftigen sich überwiegend mit isolierten Ventrikelzellen verschiedener Spezies. Eine Ausnahme bilden hierbei die Arbeiten von Hume & Giles (1981, 1983), die elektrophysiologische Untersuchungen an isolierten Vorhofzellen des Frosches durchführten. Die Vorhofzellen sind im Vergleich zu denen des Ventrikels wesentlich länger und besitzen einen geringeren Durchmesser; Mikroelektrodeneinstiche werden dadurch zusätzlich erschwert. Kürzlich sind auch zwei Arbeiten über elektrophysiologische Untersuchungen an isolierten Vorhofzellen des Meerschweinchenherzens (Belardinelli & Isenberg, 1983) und Zellen des AV- und Sinusknotens (Taniguchi et al., 1981; Sakmann et al., 1983) erschienen. Diese Zellen zeigen bei Applikation des parasympathischen Transmitters Acetylcholin (ACh) einen Anstieg der K-Leitfähigkeit, wie er auch an intakten Gewebepräparaten beobachtet wird.

Im Unterschied zu embryonalen Herzzellen sind bisher nur sehr wenige Veröffentlichungen über eine erfolgreiche Kultivierung von adulten Herzzellen erschienen (Claycomb et al., 1980; Schwarzfeld & Jakobson, 1981; Piper et al., 1982). Die Ursache liegt vor allem in der Schwierigkeit, Ca-tolerante Zellen zu isolieren. Adulte Zellen sind auch weniger als embryonale in der Lage, bei der Zellisolierung entstandene Schäden zu reparieren. Die genannten Untersuchungen zeigen jedoch, daß eine Kultivierung adulter Zellen grundsätzlich möglich ist. Die kultivierten,adulten Zellen sind als Untersuchungsobjekte für physiologische Experimente gut geeignet, da sie mit den adulten Herzzellen in situ vergleichbar sind. Es ist daher zu erwarten, daß diese Zellkulturen in Zukunft an Bedeutung gewinnen.

4. Nachweis und Messung einzelner Ionenkanäle

Seit Hodgkin & Huxley (1952d) in ihrer grundlegenden Arbeit eine komplette, quantitative Analyse der ionalen Ströme am Tintenfischriesenaxon vorgelegt haben, wurde die Vermutung zunehmend erhärtet, daß die Membran bestimmte, spezialisierte Durchtrittsöffnungen für Ionen besitzt. Die genannten Autoren wiesen die Unabhängigkeit passiver Ionenbewegungen (in diesem Fall von K- und Na-Ionen) voneinander und von der Stoffwechselenergie nach. Die Ionenströme folgten nur ihrem jeweiligen elektrochemischen Gradienten. Im Gegensatz zu früheren Vorstellungen eines unspezifischen Membrandurchtritts der Ionen mußten aufgrund der Ergebnisse von Hodgkin & Huxley hochselektive, spannungsabhängige Durchtrittsöffnungen in der Membran gefordert werden.

Moore et al., (1967) gelang der Nachweis, daß die Durchtrittsöffnungen für Na-Ionen im Vergleich zum Ionenradius an weit voneinandergelegenen Punkten der Membran anzutreffen sind. Mit Hilfe der spezifischen Bindung von Tetrodotoxin (TTX), einem Nervengift des japanischen Pufferfisches Fugu, konnten sie am Nerven des Hummers in einer eindrucksvollen Untersuchung eine maximal mögliche Anzahl von Na-Durchtrittsöffnungen, im

folgenden als Na-Kanäle bezeichnet, von 13 pro μm^2 bestimmen. Setzte man die geringe Anzahl der Na-Kanäle mit dem gemessenen Na-Strom in Beziehung, so ließen sich die resultierenden hohen Durchtrittsraten der Kanäle nur mit der Vorstellung vereinbaren, daß es sich bei Kanälen um wässerige Poren in der Membran handelt.

Diskrete Stromfluktuationen, wie sie beim Öffnen und Schließen einzelner Ionenkanäle auftreten, wurden von Bean und seinen Mitarbeitern (1969) bei einem Porenbildner in künstlichen Membranen zum ersten Mal gemessen. Die Substanz EIM (excitability inducing material), bekannt für ihre Eigenschaft, in künstlichen Membranen Phänomene elektrischer Erregbarkeit zu induzieren, erzeugte stufenartige Stromänderungen mit einheitlicher Amplitude, die als Einzelkanalströme interpretiert wurden. Der Anstoß für einen direkten Nachweis einzelner Ionenkanäle in biologischen Membranen war damit gegeben.

Ein weiterer entscheidender Fortschritt zum direkten Nachweis biologischer Ionenkanäle wurde mit der Methode der elektrischen Rauschanalyse (noise analysis) erzielt. Katz & Miledi (1970) konnten an der motorischen Endplatte der Skelettmuskelfaser die durch das unabhängige Öffnen und Schließen einzelner Kanäle bewirkte Zunahme des elektrischen Stromrauschens nachweisen. Aus dem Stromrauschen ließen sich unter bestimmten Annahmen die Eigenschaften biologischer Ionenkanäle ableiten. So gestattete die Rauschanalyse eine erste unmittelbare Berechnung der Einzelkanalleitfähigkeit und der mittleren Kanaloffenzeit.

Die direkte Messung der Ionenströme durch einzelne Kanäle in der biologischen Membran gelang aber erst mit der Entwicklung der "Patch-clamp-Technik" durch Neher & Sakmann (1976; Neher et al., 1978) und insbesondere mit der verbesserten Patch-clamp-Technik (Hamill et al., 1981). Die letztgenannte Methode erlaubte den unmittelbaren Nachweis von Ionenkanälen in Membranen von nahezu allen elektrisch erregbaren Zellen. Darüber hinaus bietet diese Technik unvergleichliche Möglichkeiten und Vorteile bei der Unter-

suchung von Einzelzellen. Mit einer Mikroelektrode ist beispielsweise die Spannungs- und Stromableitung bei geklemmtem Membranpotential ebenso möglich wie die Registrierung einzelner Ionenkanäle oder die Rauschanalyse (vgl. z. B. Fenwick et al., 1982). Die Messungen können bei geeigneten Voraussetzungen an der gesamten Einzelzelle oder an isolierten Membranstücken vorgenommen werden.

Bei der Patch-clamp-Technik wird, ähnlich wie bei der Saugelektrode, eine an der Spitze "polierte" Glasmikropipette (Patchpipette) auf eine zuvor gereinigte Membran so aufgesetzt, daß sich nach Anlegen eines geringen Unterdrucks eine enge Verbindung zwischen Membran und Glaselektrode ausbildet. Diese Verbindung besitzt im günstigen Fall einen elektrischen Abdichtungswiderstand von mehr als 10^9 Ω und eine hohe mechanische Stabilität. Damit ist der Membranbereich unter der Öffnung der Elektrode, der "Membranpatch", mechanisch und elektrisch von der übrigen Membran isoliert. Ströme durch einzelne Ionenkanäle mit Amplituden von wenigen pA können mit einem geeigneten Verstärker ohne Schwierigkeit gemessen werden. Die mechanische Stabilität der Membran-Glas-Verbindung erlaubt es, das isolierte Membranstück von der Zelle abzuziehen, um so Messungen an zellfreien Membranstücken vornehmen zu können.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Patch-clamp-Technik liegt in der Forderung einer sauberen, gereinigten Membranoberfläche. In den meisten Fällen kann dies durch eine enzymatische Behandlung des Gewebes sichergestellt werden. Bei isolierten Zellen hingegen benötigt man normalerweise keine zusätzlichen Maßnahmen; die Zellen verfügen aufgrund der enzymatischen Isolierung bereits über eine ausreichend saubere Membranoberfläche.

Mit der verbesserten Patch-clamp-Technik wurden in kurzer Zeit an einer Vielzahl verschiedener Präparate Ionenkanäle nachgewiesen (u. a. ACh-Kanäle: Colquhoun & Sakmann, 1981; Hamill & Sakmann, 1981; Na-Kanäle: Sigworth & Neher, 1980; Patlak & Horn, 1982; Glutamat-Kanäle: Gration et al., 1982; K-Kanäle: Lux et al., 1981; Marty, 1981; Ohmori et al., 1981; Palotta et al., 1981; Fukushima, 1982; Methfessel & Boheim, 1982; Ca-Kanäle: Lux & Nagy,

1981; Fenwick et al., 1982). Über Einzelkanaluntersuchungen am Herzen sind bisher nur wenige kurze Veröffentlichungen erschienen; so konnten K-Kanäle (Trube et al., 1981; Trautwein et al., 1982; Sakmann et al., 1983; Trube & Hescheler, 1983), Ca-Kanäle (Reuter et al., 1982; Cavalie & Trautwein, 1983, Pelzer & Ochi, 1983), Na-Kanäle (Cachelin et al., 1983) und ein unspezifischer Kationenkanal (Colquhoun et al., 1981) identifiziert werden. Die weitere Untersuchung der bisher identifizierten Kanäle sowie eine Charakterisierung anderer, vorhandener Kanäle ist beim Herzen in besonderem Maße von der Verfügbarkeit geeigneter Präparate abhängig.

Die vorliegende Untersuchung beschreibt eine Methode zur routinemäßigen Isolierung und Kultivierung einzelner adulter Herzzellen des rechten Meerschweinchenvorhofs. Die elektrophysiologischen Eigenschaften der frisch isolierten Zellen werden untersucht und mit denen des intakten Gewebes verglichen. Die Zellkultur dieser ausdifferenzierten Zellen ermöglicht eine problemlose Haltung und Verfügbarkeit geeigneter Versuchsobjekte bei einer gleichzeitigen, erheblichen Einsparung an Versuchstieren. Die kultivierten Vorhofzellen erfüllen in besonderem Maße die Voraussetzungen für eine Anwendung der Patch-clamp-Technik; Untersuchungen in allen Ableitkonfigurationen sind möglich. Die weiteren Experimente konzentrieren sich auf die Charakterisierung und Analyse verschiedener K-Ströme sowohl in der Ableitung von der gesamten Einzelzelle als auch auf der Ebene einzelner Ionenkanäle. Die Wahl geeigneter Ableitbedingungen erlaubt dabei einen direkten Vergleich der Eigenschaften von K-Strömen mit dem Verhalten von K-Kanälen. Die grundsätzlichen Kennzeichen der K-Ströme am Herzen, die Aktivierung durch ACh, die Einwärtsgleichrichtung sowie die Blockierung durch Ba-Ionen, können auf charakteristische Eigenschaften der Einzelkanäle zurückgeführt und analysiert werden. Die Ergebnisse werden schließlich im Zusammenhang mit Vorstellungen über den Aufbau von K-Kanälen diskutiert.

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde bereits vorab veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht (vgl. hierzu den Anhang zum Literaturverzeichnis S. 150).

II. METHODIK

Isolierung und Kultur der Vorhofzellen

Zur Isolierung von ausdifferenzierten Herzzellen des rechten Meerschweinchenvorhofs wurde eine Modifikation der von Powell et al. (1980) beschriebenen Methode verwendet. Die Tiere (ca. 200 g schwere Meerschweinchen beiderlei Geschlechts) erhielten zunächst ca. 1 Stunde vor Versuchsbeginn eine Dosis von 10 mg Heparin (Serva, Nr. 24590; 168.200 I.E./g) i.p. injiziert, um während der Präparation eine vorzeitige Blutgerinnung und damit einen Verschluß der Koronargefäße zu verhindern.

Die Tiere wurden durch Genickschlag getötet, aus den Carotiden entblutet und durch Besprühen mit Alkohol (70 %) oberflächlich sterilisiert. Die weitere Präparation erfolgte aus Gründen der Sterilität in einem Reinluftraum (Prettl LFR 80VS 0615) mit den üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Arbeiten mit Zellkulturen (eine ausführliche Darstellung der apparativen Erfordernisse und Arbeitsweisen beim Umgang mit Zellkulturen wird von Paul 1975 gegeben). Nach Eröffnen des Brustraums wurden ca. 10 ml einer Ca-freien Tyrodelösung (Lösung A mit dem Zusatz von 5 mg/10 ml Heparin, s.o.) in die linke Kammer des Herzens injiziert. Dadurch konnten die Koronarien vom Blut befreit und das Herz für die weitere Präparation stillgestellt werden. Anschließend wurde in möglichst kurzer Zeit (2-3 Minuten) eine Kanüle in den freipräparierten Aortenstumpf eingebunden, das isolierte Herz an eine Perfusionsapparatur angeschlossen und entsprechend einer Langendorffperfusion retrograd über die Koronarien mit den Lösungen durchströmt. Die Perfusionsapparatur bestand aus einer Haltevorrichtung zum Aufstecken und Befestigen der Aortenkanüle sowie aus einem Zuleitungsschlauch, durch den mit Hilfe einer Pumpe die angewärmten und mit Carbogen (95% O_2, 5% CO_2) begasten Lösungen in die Koronarien gedrückt wurden. Als Vorratsgefäß diente ein thermostatiertes (35^{o} C) Organbad. Zum Lösungswechsel

wurde die Perfusion kurzzeitig unterbrochen und die Lösung im Vorratsgefäß ausgetauscht. Während der ersten 5 Minuten erfolgte eine Perfusion des Herzens mit einer Ca-freien Tyrodelösung (Lösung A) und anschließend mit der Enzymlösung (Lösung B, ca. 30 ml) unter Rückfluß, indem das Herz in das Vorratsgefäß überführt wurde. Zur Verbesserung der Durchströmung des Vorhofgewebes wurden die in den Vorhof einmündenden Gefäßstümpfe so abgebunden, daß der Perfusionsdruck den rechten Vorhof stark aufblähte und die Lösung durch die Vorhofwand gedrückt wurde. Der konstantgehaltene Lösungsfluß betrug je nach Größe des Herzens ca. 5-10 ml/min.

Die Perfusion wurde solange fortgesetzt (ca. 60 min), bis daß deutlich sichtbare Strukturveränderungen des Vorhofs und Ventrikels sowie das Erscheinen von Einzelzellen in der Perfusionslösung einen ausreichenden Abbau des Gewebes anzeigten. Zu diesem Zeitpunkt wurden mit einer stumpfen Pasteurpipette isolierte Einzelzellen und auch größere, noch zusammenhängende Gewebestücke vorsichtig vom rechten Vorhof entnommen und in vorgewärmte Petrischalen (Falcon, Gewebekulturschale, 35 x 10 mm, Nr. 3001 F) überführt. Behutsames Pipettieren und Bewegen der verbliebenen Stücke führten zu einer vollständigen Auflösung des Gewebeverbandes und zur Freisetzung der Einzelzellen.

Nachdem sich die Zellen auf dem Boden der Petrischalen abgesetzt hatten, wurden die Schalen zunächst tropfenweise mit Kulturmedium aufgefüllt und anschließend mehrmals gewechselt, bis die Enzymlösung komplett gegen Kulturmedium ausgetauscht war. Zum Abschluß wurden die Zellen mit einer Dichte von ca. 10^3 - 10^4 Zellen pro Kulturschale ausgeplattet und die Schalen mit 2 ml Kulturmedium aufgefüllt. Von einem Herzen konnten auf diese Weise 20-30 Kulturen hergestellt werden. Die Kulturen wurden in einem CO_2-Inkubator (Heraeus B 5060) bei 37° C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 1 % CO_2 aufbewahrt. Während der ersten 48 Stunden wurden die Kulturen nicht bewegt, um das Anheften der Zellen am Boden des Kulturgefäßes nicht zu behindern. Das Kulturmedium wurde im Abstand von zwei Tagen gewechselt.

Lösungen

Die üblicherweise verwendete Tyrodelösung hatte folgende Zusammensetzung (in mM): NaCl 137; KCl 5,0; $MgCl_2$ 1,0; $CaCl_2$ 1,0; NaH_2PO_4 0,42; $NaHCO_3$ 11,9; Glukose 5,0. Die Lösungen wurden mit Carbogen (95 % O_2, 5 % CO_2) begast, um einen pH-Wert von 7.4 einzustellen. Lösung A war eine Ca-freie Tyrodelösung, die zusätzlich 10^{-4} M EGTA (Serva Nr. 11290) enthielt. Lösung B, einer ebenfalls Ca-freien Tyrodelösung, wurden 1,5 mg/ml Collagenase (Sigma 2139), 10 µl/ml Elastase-Suspension (Serva Nr. 20931), 0,5 mg/ml Protease (Sigma Nr. P-6141, Typ IX), 1 mg/ml Rinderserumalbumin (Sigma Nr. A-6003), 10 mmol/l HEPES-NaOH pH 7.4 und 20 µmol/l $CaCl_2$ zugesetzt. Während der Perfusion wurde die Ca-Konzentration im zeitlichen Abstand von jeweils 10 Minuten um je 20 µmol/l erhöht. In einigen Versuchen wurde die K-Konzentration im Bereich von 2-20 mM ohne osmotischen Ausgleich variiert.

Als Kulturmedium diente Medium 199 (Firma: Gibco Nr. 041-2350) mit Hanks'-Salzen und dem Zusatz von 25 mM HEPES, 100 mg/l Glutamin, 50 I.U./ml Gentamycin sowie 5% NU-Serum (Firma: Paesel).

Die Patchpipetten wurden mit einer Lösung folgender Zusammensetzung gefüllt (in mM): KCl 140; HEPES-NaOH (pH 7,2) 10. Die Lösung enthielt aufgrund von Verunreinigungen Ca-Ionen in einer Konzentration von ca. 5-10 µM. Durch Zugabe von 1 mM EGTA konnte die Ca-Konzentration auf ca. 10^{-8} - 10^{-9} M abgesenkt und durch Zusatz von $CaCl_2$ bis auf 10^{-4} M erhöht werden.

Versuchsaufbau

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die Kulturschalen auf dem Objekttisch eines Umkehrmikroskops (Zeiss IM 35) befestigt und an eine Durchflußapparatur angeschlossen, so daß die Zellen im Versuch kontinuierlich mit Tyrodelösung bespült werden konnten. Zur Untersuchung der frisch isolierten Zellen wurde die Badflüssigkeit auf 34 ± 1° C thermostatiert; bei allen übrigen Experimenten erfolgte die Messung bei Raumtemperatur (ca. 23-26° C). Über einen Mikromanipulator (Narishige MO-103), an dem der Vorverstärker festmontiert war, konnten

die Elektroden vibrationsfrei geführt und mit den Einzelzellen unter optischer Kontrolle in Berührung gebracht werden. Der Objekttisch des Mikroskops war zur elektrischen Abschirmung von einem Faradaykäfig umgeben, in den die Elektroden durch eine schlitzförmige Öffnung von der Seite eingeführt werden konnten.

Zum Befestigen der Glasmikropipetten (Patchpipetten) am Vorverstärker wurde der von Hamill et al. (1981) entwickelte Elektrodenhalter benutzt (linker, waagerechter Teil in Abb.1). Der Halter paßte mit seinem BNC-Stecker in den BNC-Anschluß am Vorverstärker. Über einen Schlauchanschluß konnte Unter- bzw. Überdruck auf die Pipette gegeben werden. Da eine senkrechte Führung der Patchpipetten die Entstehung des hohen Abdichtwiderstands begünstigte, wurde der Elektrodenhalter durch ein abgewinkeltes Glasrohr verlängert. Die Patchpipetten wurden jeweils in die Öffnung dieses Verlängerungsstücks mit Hartklebewachs (Deiberit 502, Firma Böhme KG) eingeklebt. Ein chlorierter Silberdraht diente als elektrische Verbindung zwischen dem BNC-Stecker des Halters und der Elektrodenlösung in der Spitze der Patchpipette (vgl. Abb. 1 Nr. 4).

In einigen Versuchen war es erforderlich, die Lösung in der Spitze der Patchpipetten durch Freisetzen einer Testlösung zu verändern. Hierzu wurde ein spezieller Elektrodenhalter entwickelt, der in Abb. 1 dargestellt wird. Der ursprüngliche Halter ist durch ein schräggestelltes Rohr erweitert worden, das zur Führung einer inneren Glaskapillare dient (Abb. 1 Nr. 2). Die innere, mit der Testlösung gefüllte Kapillare war bis auf einen Spitzendurchmesser von ca. 20 µm ausgezogen und konnte über einen Mikromanipulator bis in die Spitze der Patchelektrode (Abb. 1 Nr. 1) vorgeschoben werden (Abstand zur Spitze je nach Form der Elektroden ca. 100-500 µm). Die Spitze der Glaskapillare war zu Beginn des Versuchs mit einer Luftblase verschlossen, um ein vorzeitiges Ausdiffundieren der Testsubstanz zu verhindern. Wenn mehrere, verschiedene Testlösungen benötigt wurden, so konnten diese ebenfalls durch Luftblasen voneinander getrennt und sukzessiv freigesetzt werden.

Die Testlösung konnte durch Überdruck aus der Glaskapillare freigesetzt werden (Anschluß des Druckschlauchs bei Nr. 3 in Abb. 1). Als besonders vorteilhaft erwies sich, daß ein Wechsel der Patchpipetten ohne mikroskopische Kontrolle möglich war, da die innere Glaskapillare zu diesem Zweck zurückgezogen und daher nicht beschädigt wurde. Bei erfolglosen Versuchen konnte so die Patchpipette ohne Schwierigkeiten schnell gewechselt werden. Erst bei erfolgreicher Ausbildung einer stabilen Ableitung wurde die innere Kapillare dann wieder bis zur Spitze vorgeschoben. Sowohl die Patchpipetten als auch die inneren Glaskapillaren wurden durch Eintauchen in die jeweiligen Lösungen von der Spitze her gefüllt.

Als Spannungsverstärker wurde ein Kathodenfolger (WPI Model M-707) benutzt, der auch zur Reizung der Zellen mit konstanten Strompulsen Verwendung fand. Die Stromsignale wurden mit einem Patch-clamp-Verstärker (List L/M-EPC 5) verstärkt. Die Strom- bzw. Spannungssignale wurden mit einem Oszilloskop (Tektronix 5111) dargestellt und mit einem Bandgerät (Bell & Howell VR 3200) aufgenommen. Als Reizgeräte dienten ein Funktionsgenerator (Hewlett-Packard 3310 A) und ein Rechteckpuls-Stimulator (Grass S 88).

In einigen Experimenten erfolgte eine ionophoretische Freisetzung von Acetylcholin (ACh) aus einer hochohmigen Glasmikroelektrode (50-100 MΩ), die mit einer 0,5 M ACh-Chloridlösung gefüllt war. Ein spezieller Ionophoresekonstanter (vgl. Dreyer & Peper, 1974) mit einer Ausgangsspannung von bis zu 100 V diente als Stromquelle. Die Ionophoreseelektrode wurde durch einen zweiten Mikromanipulator geführt und konnte unter mikroskopischer Kontrolle bis in die unmittelbare Nähe der Einzelzellen gefahren werden. Da die ionophoretische ACh-Freisetzung nur einer Kontrolle der Empfindlichkeit der Zellen für ACh diente, wurden die freigesetzten Mengen nicht quantifiziert.

Versuchsdurchführung

Die Strom- und Spannungsmessungen wurden mit Patchelektroden nach Hamill et al. (1981) unter Verwendung von handelsüblichem Pyrexglas durchgeführt. An einem Mikroelektrodenzieh-

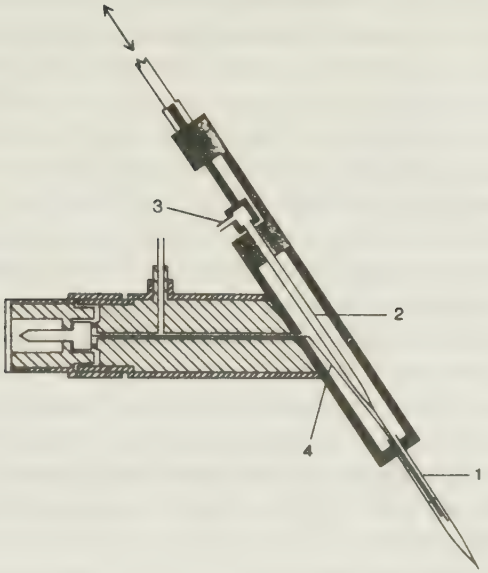


Abb. 1: Darstellung des Pipettenhalters (verändert nach Hamill et al. 1981). Der linke, waagerechte Teil entspricht dem ursprünglichen, von Hamill et al. entwickelten Pipettenhalter. Das schräggestellte Teil (dunkelgrau) dient der Führung einer Glaskapillare (2), aus deren Spitze Testlösungen freigesetzt werden können. Die Glaskapillare kann über einen Mikromanipulator (nicht dargestellt) bis in die Spitze der Patchpipette (1) vorgeschoben werden. Die Testlösung kann durch einen Druckpuls (Anschluß des Druckschlauches bei 3) freigesetzt werden. Ein chlorierter Silberdraht (4) stellt die elektrische Verbindung zwischen dem BNC-Stecker und der Pipettenlösung her (weitere Erläuterungen im Text).

gerät (Hugo Sachs Elektronik, HSE-Mikroelektrodenziehgerät DC) wurden die Glasmikropipetten auf einen Spitzendurchmesser von 2-5 µm ausgezogen. Anschließend wurden die Patchpipetten an einem Mikroelektrodenarbeitsplatz unter mikroskopischer Kontrolle poliert, indem die Spitzen der Pipetten durch einen glühenden Draht erhitzt und im Durchmesser auf ca. 0.5-2 µm reduziert wurden. Die so hergestellten Patchpipetten wiesen mit den verwendeten Füllösungen einen Widerstand von 3-15 MΩ auf.

Zur Herstellung des hohen Abdichtwiderstands ("Giga-seal") wurden die Patchpipetten zunächst mit leichtem Überdruck durch die Badflüssigkeit geführt und so gegen die Zelloberfläche gedrückt, daß der Eingangswiderstand (vgl. hierzu Abb. 3) um einen Faktor 2-3 anstieg. Durch das Umschalten vom Überdruck auf einen leichten Unterdruck konnte bei erfolgreichen Versuchen ein Abdichtwiderstand vom 10-50 GΩ erzielt werden. Mit der Ausprägung dieses hohen Abdichtwiderstands wurde das bei offener Pipette sichtbare Stromrauschen um einen Faktor von 10-50 reduziert.

Eine Reihe von Faktoren, die die Ausbildung des hohen Abdichtwiderstands ermöglichen oder begünstigen, sind bei den Patch-clamp-Experimenten grundsätzlich zu beachten:

- Die Patchpipetten sollten möglichst kurz vor Versuchsbeginn gezogen und im Verlauf weniger Stunden benutzt werden.
- Die Spitzen der Patchpipetten sind vor Verunreinigungen jeglicher Art zu schützen. So sollten die Elektrodenlösungen vor der Benutzung gefiltert werden (Porenweite von 0,2-0,5 µm).
- Auch die Badlösung sollte möglichst sauber sein, um ein vorzeitiges Verstopfen der Pipetten zu verhindern.
- Beim Bewegen der Pipette durch die Badlösung hat sich ein leichter Überdruck zur Verhinderung von Verunreinigungen an der Spitze der Patchpipetten als vorteilhaft erwiesen.
- Jede Patchpipette kann nur einmal verwendet werden, d. h., nachdem der Überdruck in der Badlösung weggenommen oder eine Zelle berührt wurde, muß für einen erneuten Versuch die Patchpipette gewechselt werden.

- Nicht alle Elektrodenlösungen sind gleich gut geeignet; z. B. konnte mit Lösungen, die Phosphat oder Protein enthielten, kein hoher Abdichtwiderstand erzielt werden. Die verwendete gepufferte KCl-Lösung hingegen schien die Ausbildung des hohen Abdichtwiderstands zu begünstigen.

Neben den genannten Faktoren spielt für die erfolgreiche Durchführung von Versuchen mit Patchelektroden die Reinheit der Membranoberfläche der untersuchten Zellen eine entscheidende Rolle.

Bei der Verwendung von Patchelektroden lassen sich grundsätzlich vier verschiedene Ableitkonfigurationen unterscheiden. Wird nach der Herstellung des hohen Abdichtwiderstand, wie in Abb. 2 dargestellt, ohne weitere Änderungen mit der Ableitung begonnen, so spricht man von einem "cell attached patch" (Abk. CAP; im folgenden werden die verschiedenen Ableitkonfigurationen der Einfachheit halber mit den angegebenen Abkürzungen bezeichnet). Wie die Bezeichnung bereits aussagt, bleibt hierbei der spannungsgeklemmte Membranbereich in Kontakt mit der übrigen Zellmembran. Der Membranbereich in der Patchpipette, der Membranpatch, von dem abgeleitet wird, ist gegenüber der Badlösung vollständig abgedichtet und steht an seiner Außenseite mit der Pipettenlösung und an der Innenseite mit dem Cytoplasma in Kontakt. Die Membran in der Patchpipettenöffnung kann durch einen kurzen Unterdruckpuls zerstört werden; damit wird der Intrazellularraum zugänglich. Unter dieser Bedingung liegt - wie bei einer herkömmlichen Mikroelektrodenableitung - das Membranpotential der Zelle an der Pipette an. Gleichzeitig erlaubt diese Ableitkonfiguration aufgrund der günstigen Widerstandsverhältnisse bei hinreichend kleinen Zellen Membranstrommessungen bei geklemmtem Membranpotential; man spricht von "whole cell recording" (WCR). Die Zelle wird bei dieser Ableitkonfiguration mit der Pipettenlösung dialysiert.

Ausgehend vom WCR kann ein kleiner Membranbereich isoliert werden, indem die Elektrode vorsichtig von der Zelle abgezogen wird; man erhält den "outside-out patch" (OSOP). Die Außenseite der Membran ist dabei in Kontakt mit der Badlösung und die Innenseite mit der Elektrodenlösung.

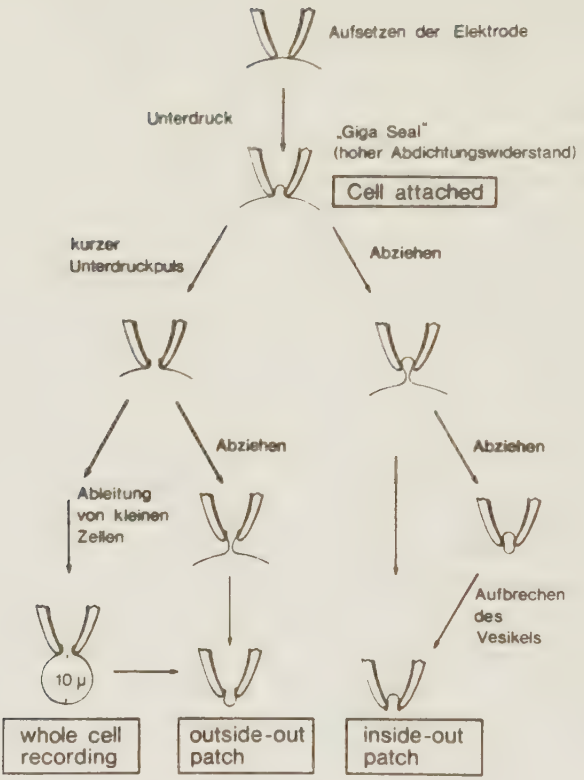


Abb. 2: Schematische Darstellung der bei der Patch-clamp-Technik möglichen Ableitkonfigurationen und ihre Herstellung (nach Hamill et al., 1981).

Wenn die Elektrode beim CAP ohne vorherige Zerstörung der Membran von der Zelle abgezogen wird, bildet sich in der Elektrodenspitze ein Membranvesikel. Durch kurzzeitiges Herausziehen der Patchpipette aus der Badlösung kann eine Hälfte des Vesikels zerstört werden, und man erhält einen "inside-out patch" (ISOP). Die Membran ist bei dieser Ableitkonfiguration im Vergleich zum OSOP in umgekehrter Weise eingespannt.

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Ableitkonfigurationen CAP, WCR und OSOP benutzt. Diese können elektrisch durch Messen der Pipettenspannung, des Eingangswiderstands und der Eingangskapazität voneinander unterschieden werden.

In Abb. 3A sind der schematische Aufbau eines einfachen Patch-clamp-Verstärkers sowie die elektrischen Verhältnisse an der Spitze der Patchpipette dargestellt.

Der Patch-clamp-Verstärker ist im Prinzip ein rauscharmer Stromspannungswandler hoher Empfindlichkeit, der im einfachsten Fall aus einem Operationsverstärker und einem hochohmigen (R_1 = 10 GΩ) Rückkopplungskreis besteht. Die Rückkopplung auf den negativen Eingang des Operationsverstärkers bewirkt, daß Eingangsströme durch den Verstärker genau kompensiert werden. Die Ausgangsspannung (U_{Aus}) ist daher ein direktes Maß für den Strom am Verstärkereingang.

Die Spannung am negativen Eingang ist stets mit der am positiven Eingang identisch, sie kann durch Vorgabe einer Haltespannung (U_{Halt}) am positiven Eingang variiert werden. Liegt der positive Eingang auf Massepotential, so wird auch der negative Verstärkereingang und damit auch die Patchpipette auf Massepotential gehalten. Durch Vorgabe bestimmter Haltespannungen können daher beliebige Pipettenspannungen eingestellt werden.

Die Spannung am Verstärkereingang liegt gleichzeitig auch an der Pipettenspitze an und fällt dort über einem Widerstandsnetzwerk ab (vgl. Abb. 3A). Der Pipettenwiderstand (R_{Pip}) liegt in Reihe mit den parallelgeschalteten Widerständen des Membranpatches (R_{Pat}) und dem Abdichtwiderstand (R_{Abd}). Für den Gesamteingangswiderstand (R_{Ein}) gilt:

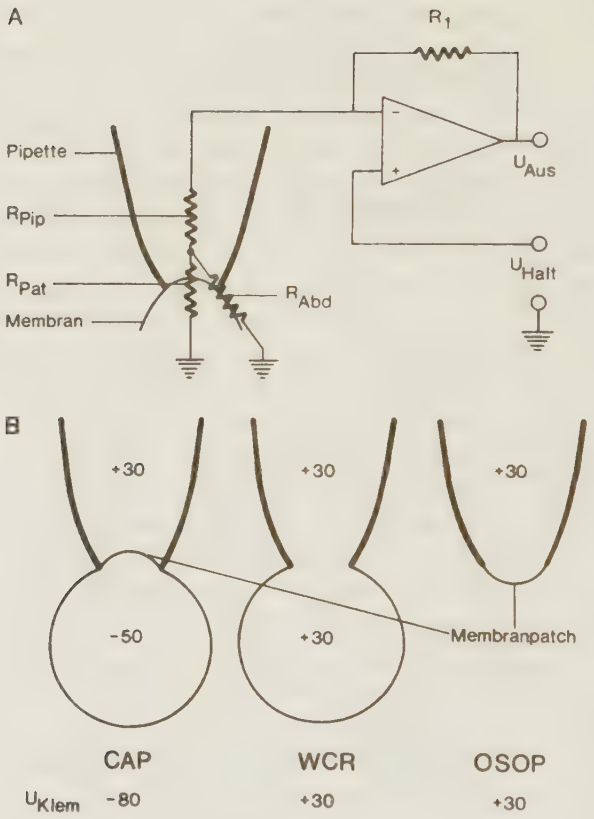


Abb. 3: A. Vereinfachtes elektrisches Schaltbild eines Patchclamp-Verstärkers sowie ein elektrisches Ersatzschaltbild der Pipettenspitze unter Ableitbedingungen (Erläuterungen im Text). B. Ein Vergleich der hier benutzten Ableitkonfigurationen (CAP, WCR und OSOP) verdeutlicht an einem Beispiel (Pipettenpotential +30 mV, Ruhepotential -50 mV) das Zustandekommen der Klemmspannung am Membranpatch bzw. der gesamten Zellmembran.

$$R_{Ein} = R_{Pip} + \frac{1}{1/R_{Pat} + 1/R_{Abd}} \qquad (2)$$

Bei offener Patchpipette ist R_{Ein} ungefähr gleich R_{Pip}, da die beiden übrigen Widerstände verschwindend klein sind. Unter dieser Bedingung läßt sich auf einfache Weise der Pipettenwiderstand bestimmen, indem die Stromänderung auf konstante Spannungspulse gemessen wird.

Nach Ausbildung eines hohen Abdichtwiderstands sind R_{Abd} und R_{Pat} sehr viel größer als R_{Pip}, daher ist $1/R_{Ein}$ ungefähr gleich der Summe $1/R_{Pat} + 1/R_{Abd}$. Der Eingangswiderstand liefert eine untere Abschätzung für den Membran- und Abdichtwiderstand, wobei im CAP und OSOP der Eingangswiderstand hauptsächlich vom Abdichtwiderstand und im WCR vom Membranwiderstand (entspricht dem gesamten Zelleingangswiderstand) bestimmt wird.

Für die Eingangskapazitäten läßt sich eine analoge Betrachtung wie für die Eingangswiderstände aufstellen. Wichtig ist hierbei, daß sich die Zellmembrankapazität aus der Differenz der Gesamteingangskapazitäten in der CAP- und WCR-Ableitung hinreichend genau bestimmen läßt. Für eine ausführliche Darstellung weiterer Einzelheiten der Patch-clamp-Technik, insbesondere über die Reduzierung des Hintergrundstromrauschens, sei auf die Arbeit von Hamill et al. (1981) verwiesen.

Aufgrund der dargestellten Widerstandsverhältnisse wird deutlich, daß die Pipettenspannung bei allen Ableitkonfigurationen die geklemmte Membranspannung festlegt, solange der Gesamteingangswiderstand sehr viel größer als der Pipettenwiderstand ist. Bei einem Pipettenwiderstand von 5 MΩ ergibt sich beispielsweise eine Abweichung der Membranspannung von dem erwarteten Wert um 1 %, wenn der Gesamteingangswiderstand 500 MΩ beträgt. Selbst bei der Ableitung von der gesamten Zelle (WCR) mit einem Zelleingangswiderstand von mehr als 200 MΩ ergibt sich noch eine ausreichend gute Spannungsklemme. Größere Fehler ergeben sich nur, wenn der Pipettenwiderstand durch ein Verstopfen der Pipettenöffnung ansteigt.

Nach Definition wird in der Elektrophysiologie die Spannung als Membranspannung angegeben, die auf der Innenseite einer Zellmembran gegen Masse in Badlösung gemessen wird. Für den Strom gilt, daß bei einem Auswärtsstrom - in den Abbildungen immer nach oben als positiver Strom aufgetragen - positive Ionen von der Innenseite nach außen oder negativ geladene Ionen von außen nach innen fließen. Entsprechend dieser Definitionen ist die Klemmspannung beim OSOP und WCR (vgl. Abb. 3B) mit der Pipettenspannung identisch; die Membranströme verhalten sich wie im herkömmlichen Spannungsklemmversuch. Beim CAP hingegen errechnet sich die Klemmspannung des Membranpatches aus der Differenz vom Ruhepotential der Zelle und der Pipettenspannung; die Membranströme sind im Vergleich zur herkömmlichen Definition, von der Pipette aus betrachtet, umgekehrt. Die Klemmspannung ist bei der CAP-Ableitung nur stabil, wenn einerseits die geklemmte Membranfläche sehr klein gegenüber der gesamten Zellmembran und andererseits das Ruhepotential konstant ist. Um eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gestatten, wurden in der vorliegenden Arbeit die Membranströme und auch die Membranspannung, wenn immer dies möglich war, nach konventioneller Definition angegeben.

In Tab. 1 werden die drei verwendeten Ableitkonfigurationen noch einmal miteinander verglichen. Für einzelne Ionenspezies ergeben sich aufgrund unterschiedlicher Klemmspannungen und Ionengradienten bei gleichem Pipettenpotential verschiedene treibende Spannungen. Es wird besonders deutlich, daß die WCR- und OSOP-Ableitung identische Bedingungen aufweisen, während die CAP-Ableitung sich grundsätzlich unterscheidet. Die Ableitkonfigurationen WCR und OSOP unterscheiden sich, wenn die intrazelluläre Lösung der Zelle durch die Pipettenlösung ausgetauscht ist, im wesentlichen nur durch die Größe der geklemmten Membran, d. h. beim WCR können, ähnlich wie im herkömmlichen Spannungsklemmexperiment, die Gesamtmembranströme analysiert werden, wohingegen beim OSOP das Messen von Einzelkanalströmen möglich ist.

Tab. 1: Vergleich der Klemmspannungen und treibenden Spannungen ($V-E_X$) bei verschiedenen Ableitkonfigurationen (Angaben in mV).

Pipettenspannung	CAP	WCR	OSOP
0			
Klemmspannung	-50	0	0
$V-E_K$	-50	100	100
$V-E_{Na}$	-50	-70	-70
$V-E_{Cl}$	0	0	0
-50			
Klemmspannung	0	-50	-50
$V-E_K$	0	50	50
$V-E_{Na}$	0	-120	-120
$V-E_{Cl}$	50	-50	-50
+50			
Klemmspannung	-100	50	50
$V-E_K$	-100	150	150
$V-E_{Na}$	-100	-20	-20
$V-E_{Cl}$	-50	50	50

Folgende Bedingungen wurden zugrunde gelegt:
Badlösung:Tyrodelösung mit 2,7 mM KCl; 140 mM NaCl usw.
Pipettenlösung: 140 mM KCl; 10 mM NaCl; 10 mM HEPES
Ionenkonzentrationen im Zellinneren: 140 mM K^+; 10 mM Na^+; 20 mM Cl^-
Ruhepotential der Zelle: -50 mV
Gleichgewichtspotentiale der verschiedenen Ionen (jeweils auf 10 mV Genauigkeit gerundet): E_K = -100 mV
E_{Na} = + 70 mV
E_{Cl} = - 50 mV

Auswertung

Die auf Band gespeicherten Strom- und Spannungsregistrierungen wurden in kurzen Stücken in einen digitalen Speicher (Datalab DL 400/450 U) eingelesen. Interessante Bereiche konnten so näher betrachtet, ausgewertet und schließlich auf einem XY-Schreiber ausgezeichnet werden. Der Averager diente auch zum Erstellen der Amplitudenhistogramme bei der Auswertung von Einzel- oder Mehrkanalregistrierungen. Beim Amplitudenhistogramm wird die Originalregistrierung zunächst mit einer hohen Geschwindigkeit (f = 10-50 kHz) digitalisiert. Die einzelnen Meßpunkte werden anschließend entsprechend ihrem jeweiligen Amplitudenwert in einem Histogramm aufgetragen. Die Ordinate im Amplitudenhistogramm gibt an, wie viele Meßpunkte mit der entsprechenden Amplitude registriert wurden. Aus dem Amplitudenhistogramm lassen sich die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der einzelnen Amplituden ermitteln, indem die Anzahl der Meßpunkte mit der Dauer der einzelnen Messung (t = 1/f) multipliziert und das Produkt durch die Gesamtanalysezeit dividiert wird.

Die Auswertung des kinetischen Verhaltens der Kanäle von Einzelkanalableitungen erfolgte mit einem Rechner (MINC/DECLAB 23). Im folgenden soll der grundsätzliche Ablauf der Analyse von Einzelkanalregistrierungen dargestellt werden. Spezielle Analysemethoden, die meist im engen Zusammenhang mit den Ergebnissen stehen, werden zusammen mit den entsprechenden Experimenten erläutert (vgl. z. B. Analyse des Ba-Blocks).

Das Öffnen und Schließen eines einzelnen Ionenkanals kann mit der verwendeten Meßapparatur zeitlich nicht aufgelöst werden. In einer kontinuierlichen Stromregistrierung mit ausreichender Amplitudenauflösung wird daher beim Öffnen und Schließen eines Ionenkanals eine rechteckige, sprunghafte Änderung des Stroms sichtbar; der Kanal ist von einem Zustand in einen anderen übergegangen. Der offene und geschlossene Zustand eines Kanals besitzen unter gegebenen Bedingungen, d. h. konstante Spannung, Temperatur, Ionen-

gradienten usw., meist definierte Stromamplituden, die sich durch den Einzelkanalstrom unterscheiden. Da der geschlossene Zustand im allgemeinen als nicht leitend angesehen wird, ist der Einzelkanalstrom in diesem Zustand per Definition gleich Null.

Bei einer Folge von Kanalöffnungen und -schließungen erhält man normalerweise eine Registrierung, wie sie in Abb. 4 schematisch dargestellt ist. Sind mehrere Kanäle des gleichen Typs im geklemmten Membranbereich aktiv, so entsteht aus der Überlagerung der verschiedenen Einzelkanalströme ein stufenartiger Verlauf mit N gleichgroßen Stufen bei N Kanälen (vgl. S. 74).

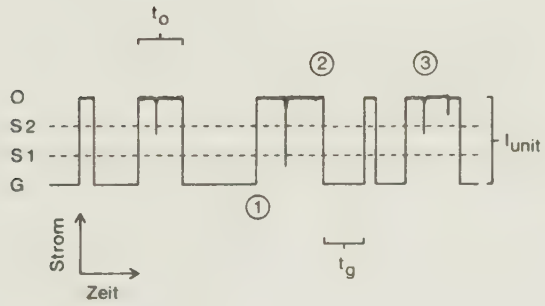


Abb. 4: Schematische Darstellung einer Einzelkanalregistrierung. O, G sind die Stromamplituden des offenen und geschlossenen Zustands des Kanals; t_o, t_g einzelne Offen- und Geschlossenzeiten. Bei 1 öffnet der Kanal und bei 2 schließt er wieder. Zum Zeitpunkt 3 kommt es zu einer unvollständigen Schließung (Flicker). S1 und S2 zeigen die Lage der Suchlinien bei der Auswertung mit dem Rechner.

Zu Beginn der Auswertung von Einzelkanalfluktuationen - insbesondere, wenn ein bisher unbekannter Kanal untersucht wird - muß die Lage des offenen und geschlossenen Zustands bestimmt und damit die Richtung des Stroms festgelegt werden. Verschiedene Beobachtungen ermöglichen diese Entscheidung:

- Die Lage der Gleichgewichtspotentiale verschiedener Ionen in bezug zur Klemmspannung erlaubt eine erste Eingrenzung der am Einzelkanalstrom beteiligten Ionen.
- Der offene Zustand zeichnet sich oftmals durch höheres Stromrauschen und durch das Vorkommen von kurzen, unvollständigen oder zeitlich nicht auflösbaren Schließungen (Flicker) aus.
- Änderungen der Ionengradienten ermöglichen die Bestimmung der permeierenden Ionenspezies; damit ist die Stromrichtung und die Lage des offenen bzw. geschlossenen Zustands festgelegt.
- Auch durch die Verwendung von Agonisten bei Rezeptor-aktivierten Kanälen oder Kanalblockern kann die Lage der Einzelkanalzustände bestimmt werden.

Eine solche Bestimmung der Lage des offenen und geschlossenen Zustands ist im allgemeinen nur einmal notwendig, da ein bestimmter Kanal im folgenden anhand seines typischen Öffnungsverhaltens leicht wiedererkannt wird.

Die schematische Einzelkanalregistrierung in Abb. 4 läßt sich nun folgendermaßen interpretieren. Zum Zeitpunkt 1 geht der Kanal vom geschlossenen in den offenen Zustand über, der Kanal öffnet. Der Kanal bleibt bis 2 offen, wo er wieder in den geschlossenen Zustand zurückfällt. Bei 3 kommt es zu einer kurzen, unvollständigen Schließung (Flicker) des Kanals, die sich aufgrund ihrer wesentlich geringeren Dauer von den vollständigen Schließungen unterscheidet. Die Zeiten, in denen der Kanal offen ist, werden als Offenzeiten oder als Offenereignisse mit einer Dauer t_o angesprochen; entsprechendes gilt für die Geschlossenzeiten (t_g).

Viele Kanäle zeigen ein wesentlich komplexeres, kinetisches Verhalten als hier dargestellt (vgl. z.B. Methfessel & Boheim,

1982). So sind beispielsweise Gruppen von kurzen Öffnungen und Schließungen durch lange Ruhe- und Inaktivierungszeiten unterbrochen. Eine solche Gruppe von Offen- und Geschlossenereignissen wird als Burst bezeichnet. Das Burstverhalten eines Kanals wird durch das Vorkommen zweier, verschiedener geschlossener Zustände mit gleicher Stromamplitude, aber grundsätzlich verschiedenen Geschlossenzeiten erklärt. In diesem Sinne entsprechen die Flicker einem weiteren geschlossenen Zustand mit Geschlossenzeiten, die teilweise unterhalb der Auflösungsgrenze der Meßapparatur liegen. In den meisten Fällen muß also angenommen werden, daß ein Kanal mehrere geschlossene und offene Zustände besitzen kann, wobei nur die Übergänge von einem offenen in einen geschlossenen und umgekehrt direkt beobachtet werden können.

In einer Einzelkanalregistrierung können drei charakteristische Größen bestimmt werden: 1. der Einzelkanalstrom (I_{Unit}); 2. die Offen- und Geschlossenwahrscheinlichkeit; 3. aus den Verteilungen der Offen- und Geschlossenereignisse die Offen- und Geschlossenzeitkonstanten (τ_o, τ_g).

Der Einzelkanalstrom entspricht dem Amplitudenunterschied zwischen dem offenen und geschlossenen Zustand. Er kann durch Ausmessen verschiedener Ereignisse oder aus dem Abstand der Maxima im Amplitudenhistogramm ermittelt werden. Aus der Abhängigkeit des Einzelkanalstroms von der Membranspannung und der treibenden Spannung ($V-E_x$) für die bestimmte Ionenspezies (x) lassen sich die Einzelkanalleitfähigkeit und -selektivität bestimmen.

Ein weiteres typisches Merkmal einer Einzelkanalregistrierung ist die Offenwahrscheinlichkeit (P_o). Sie gibt an, wie groß der zeitliche Anteil des offenen Zustands an der Gesamtdauer der Registrierung ist.

$$P_o = \frac{\Sigma t_o}{\Sigma t_o + \Sigma t_g} \qquad (3)$$

t_o und t_g sind die einzelnen Offen- bzw. Geschlossenzeiten. Die Offenwahrscheinlichkeit kann entweder aus der Summe der

individuellen Offen- und Geschlossenzeiten oder aus dem Amplitudenhistogramm durch die Integration der Kurvenabschnitte berechnet werden, die dem offenen bzw. geschlossenen Zustand entsprechen.

Die Bestimmung der individuellen Offen- und Geschlossenzeiten einer Einzelkanalregistrierung erfolgte mit Hilfe eines speziellen Auswerteprogramms (nach Methfessel & Boheim, 1982). Die auf Band gespeicherten Registrierungen wurden zunächst mit einer Frequenz von 1000 Hz (bei den Versuchen zum Ba-Block mit 2000 Hz) digitalisiert und gespeichert. Das Auswerteprogramm erlaubte, wie in Abb. 4 schematisch dargestellt, die Unterscheidung zwischen dem offenen und geschlossenen Zustand durch die Vorgabe von zwei Suchlinien. Alle zusammenhängenden Meßpunkte, die oberhalb der Suchlinie 2 lagen, wurden als Offenereignisse und die Werte, die unterhalb von Suchlinie 1 lagen, als Geschlossenereignisse gewertet. Die Werte zwischen den beiden Suchlinien wurden dem jeweils zuletzt vorgekommenen Ereignis hinzugerechnet. Eine Öffnung oder Schließung des Kanals wurde danach vom Rechner erst dann erkannt, wenn beide Suchlinien gleichzeitig passiert wurden. Damit war ausgeschlossen, daß die Spitzen des Stromrauschens oder kurze Flicker irrtümlich als Schließungen oder Öffnungen interpretiert wurden. Größere Störungen, die beide Suchlinien passierten, aber nur von kurzer Dauer waren, wie z.B. kapazitive Artefakte, konnten durch die Wahl von minimalen Offen- bzw. Geschlossenzeiten von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Mit der Wahl einer bestimmten minimalen Offen- oder Geschlossenzeit registrierte der Rechner nur Ereignisse von längerer Dauer als vorgegeben.

Da die Vorgabe der Suchlinien und der minimalen Offen- und Geschlossenzeiten einen erheblichen Einfluß auf die bestimmten Zeitkonstanten hat (vgl. Methfessel & Boheim, 1982), wurden bei der Auswertung folgende Parameter beibehalten: Suchlinie 1 lag bei 1/3 und Suchlinie 2 bei 2/3 des Einzelkanalstroms; die minimalen Offen- und Geschlossenzeiten betrugen im allgemeinen 3 ms und bei der Analyse des Ba-Blocks 0,5 ms.

Die vom Rechner sukzessiv erkannten Offen- und Geschlossenereignisse wurden, charakterisiert durch ihre zeitliche Dauer und Amplitude, zunächst abgespeichert und später in der Form von Amplituden- und Lebensdauerverteilungen ausgezeichnet.

Die einzelnen Offen- (t_o) und Geschlossenzeiten (t_g) sind zeitlich unabhängige, statistisch verteilte Variablen, die jeweils angeben, nach welcher Zeit der Kanal von einem offenen in einen geschlossenen Zustand und umgekehrt übergeht. Charakteristisch für solche Übergänge zwischen zwei definierten Zuständen sind die Geschwindigkeitskonstanten des Übergangs. Diese Geschwindigkeitskonstanten sind von den Systembedingungen (Temperatur, Membranspannung, usw.) abhängige Größen, die sich aus der Verteilung der individuellen Offen- und Geschlossenzeiten bestimmen lassen. Für den einfachsten Fall, dem Vorhandensein eines offenen (O) und eines geschlossenen (G) Zustands, gilt folgendes Reaktionsschema:

$$G \underset{k_o}{\overset{k_g}{\rightleftharpoons}} O \qquad (4)$$

k_o, k_g sind die Geschwindigkeitskonstanten des Übergangs von $O \longrightarrow G$ bzw. $G \longrightarrow O$.

Die Wahrscheinlichkeit $P_o(t)$, daß der Kanal, der zum Zeitpunkt t=O geöffnet hat, zum Zeitpunkt t noch offen ist, ohne zwischenzeitlich geschlossen zu haben, läßt sich durch die folgende Differentialgleichung beschreiben (Neher & Steinbach, 1978; Colquhoun & Hawkes, 1981; Methfessel & Boheim, 1982):

$$\frac{d}{d(t)} P_o(t) = - P_o(t) k_o \qquad (5)$$

Ist der Übergang aus dem offenen Zustand in verschiedene geschlossene Zustände möglich, muß anstatt der Konstanten k_o die Summe der Übergangskonstanten in die möglichen Zustände eingesetzt werden. Die Lösung der Differentialgleichung lautet:

$$P_o(t) = \exp(-k_o t) \qquad (6)$$

Die Wahrscheinlichkeit ($P_o(t)$), daß ein Offenereignis zur Zeit t noch andauert, nimmt also exponentiell mit der Lebensdauer entsprechend Gl. 6 ab. Betrachtet man nun eine Verteilung von N_0 unabhängig ausgewählten, zum Zeitpunkt t=0 beginnenden Offenereignissen (entsprechendes gilt auch für die Geschlossenereignisse), so ergibt sich aufgrund obiger Beziehung für die Anzahl der Ereignisse N(t), die zum Zeitpunkt t noch andauern:

$$N(t) = N_0 \exp(-k_o t) = N_0 \exp(-t/\tau_o) \qquad (7)$$

$\tau_o = 1/k_o$ ist dabei die Offenzeitkonstante des Kanals. Gleichung (7) erlaubt einen direkten Vergleich mit dem radioaktiven Zerfallsgesetz; eine Anzahl (N_0) von Offenereignissen "zerfällt" mit exponentieller Zeitkonstanten (τ_o). Aus der halblogarithmischen Auftragung von N(t) gegen die Lebensdauer (t) der Ereignisse läßt sich aus der resultierenden Regressionsgeraden die Zeitkonstante τ_o bestimmen, die bei idealer Verteilung der Offenereignisse mit der mittleren Zeitkonstanten $\bar{t}_o = \Sigma t_o / N_0$ identisch ist. Eine ausführliche Darstellung der mit der Analyse von Einzelkanälen verbundenen statistischen Probleme ist in den Arbeiten von Colquhoun & Hawkes (1977, 1981, 1982) zu finden.

III. ERGEBNISSE

1. Die Isolierung und Kultivierung von adulten Vorhofzellen

Powell et al. haben 1980 eine Methode zur einfachen Isolierung von adulten, Ca-toleranten Herzzellen des Rattenventrikels beschrieben. Durch die Anwendung einer Langendorff-Perfusionstechnik konnten die enzymhaltigen Lösungen über die Blutkapillaren ohne lange Diffusionswege im Gewebe verteilt und so ein effektiver Abbau integrierender Gewebestrukturen erreicht werden. Obwohl das Kapillarnetz der Vorhöfe im Vergleich zum Ventrikel weniger stark ausgeprägt ist, kann die Langendorff-Perfusion auch zur Isolierung von adulten Vorhofzellen eingesetzt werden. In der vorliegenden Untersuchung wurde die von Powell et al. (1980) angegebene Isolierungstechnik so modifiziert, daß gut reproduzierbar lebensfähige, Ca-tolerante Vorhofzellen isoliert werden konnten. Der Ablauf der Zellisolierung wurde ausführlich in der Methodik beschrieben. An dieser Stelle soll auf die wichtigsten Schritte der Isolierung eingegangen werden, soweit sie die Lebensfähigkeit der Einzelzellen und die Ausbeute betreffen. Da die Methode rein empirisch ist, läßt sich nicht entscheiden, inwieweit die verwendeten Lösungen und der gesamte Ablauf der Zellisolierung die notwendigen Minimalvoraussetzungen einer erfolgreichen Isolierung darstellen.

Methodisch gesehen lassen sich bei der Zellisolierung drei Schritte unterscheiden:

1. Die Zellen werden elektrisch durch niedrige, extrazelluläre Ca-Konzentration entkoppelt.
2. Die stabilisierende Bindegewebsstruktur wird durch geeignete Enzyme (Collagenase, Elastase, Proteasen) abgebaut.
3. Die Zellen werden mechanisch dissoziiert und wieder in physiologische Lösung überführt.

Zu 1. Während der ersten Phase der Perfusion muß sichergestellt werden, daß die freie Ca-Konzentration durch EGTA auf sehr niedrige Werte abgesenkt wird, um die Zellen effektiv zu entkoppeln. Gelegentlich kam es zu einer unbefriedigenden Entkopplung der Zellen, da die freie Ca-Konzentration nicht weit genug ernied-

rigt werden konnte. Dies hatte zwei Ursachen: 1. war die Pufferkapazität des EGTA in einigen Versuchen durch zusätzliche Ca-Verunreinigungen aus den verwendeten Lösungen und Glasgefäßen bereits erschöpft; 2. es konnte gelegentlich keine ausreichende Perfusion des Gewebes erzielt werden, da die Blutgefäße durch Gerinnsel verschlossen waren. Unter beiden Bedingungen findet man selbst bei gutem enzymatischen Abbau des Gewebes nahezu keine intakten, langgestreckten Zellen. Die isolierten Zellen sind vielmehr stark kontrahiert, zeigen Membranblasen, die schließlich zerplatzen und den Zellinhalt in die umgebende Lösung entlassen.

Zu 2. In der zweiten Phase wird die Ca-Konzentration der Perfusionslösung wieder schrittweise auf ca. 10^{-4} M erhöht, um einerseits eine durch längere Perfusion mit Ca-freien Lösungen verursachte irreversible Zellschädigung (Ca-Paradox; Zimmermann & Hülsmann, 1966) zu vermeiden und um andererseits die Aktivität der Ca-abhängigen Collagenase zu erhöhen. Zum Abbau der Bindegewebsstrukturen hat sich nach meinen Erfahrungen die in der Methodik angegebene Kombination von Collagenase, Elastase und unspezifischer Protease am besten bewährt. Die verwendete Collagenase ist ein wenig gereinigtes Gemisch verschiedener proteolytischer Enzyme. Beim Austesten verschiedener Collagenasetypen stellte sich heraus, daß neben der Collagenaseaktivität auch die unspezifische Proteaseaktivität eine entscheidende Rolle beim Abbauprozeß spielen. Daher wurden insbesondere Collagenasetypen mit niedriger unspezifischer Proteaseaktivität durch Zugabe einer Protease in ihrer Wirksamkeit gesteigert.

Zu 3. Die dritte Phase hat sich als besonders schwierig erwiesen, wie sich schon allein aus der Anzahl von Publikationen ergibt, die sich mit der Isolierung von Ca-toleranten Herzzellen beschäftigen (u.a. Altschuld et al., 1980; Haworth et al., 1980; Russo et al., 1981; Isenberg & Klöckner,1982a; Piper et al., 1982). Nach meinen Erfahrungen lassen sich die Schwierigkeiten unter der Berücksichtigung der folgenden Punkte überwinden:

- Die Zellen sind aufgrund ihrer Gestalt sehr empfindlich gegenüber starken Strömungen in der Flüssigkeit und mecha-

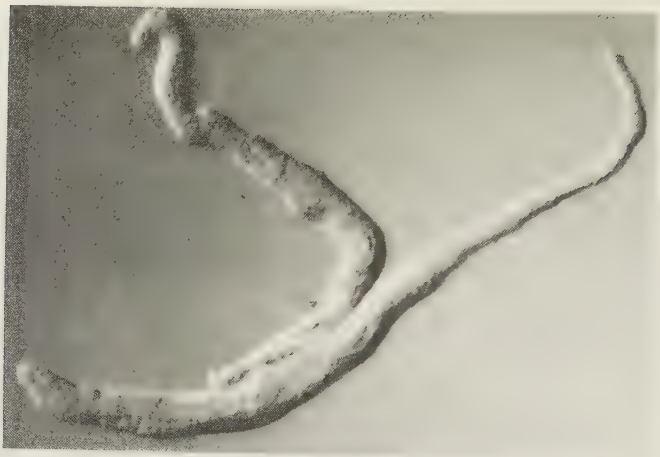
nischer Beanspruchung durch verschiedene Manipulationen, wie Pipettieren, Zentrifugieren, Filtrieren. Diese Manipulationen sind auf ein Minimum zu beschränken.

- Eine Abkühlung der Zellen nach der Isolierung unter 30° C sollte möglichst vermieden werden, um ein Ansteigen der intrazellulären Na- und Ca-Konzentration infolge geringerer Stoffwechselleistung zu verhindern (vgl. Altschuld et al., 1980).
- Die extrazelluläre Ca-Konzentration sollte möglichst langsam auf physiologische Werte erhöht werden.
- Eine sehr schonende Dissoziation des Gewebes kann erreicht werden, indem die Perfusion zeitlich soweit ausgedehnt wird, bis eine leichte Freisetzung der Zellen möglich ist.

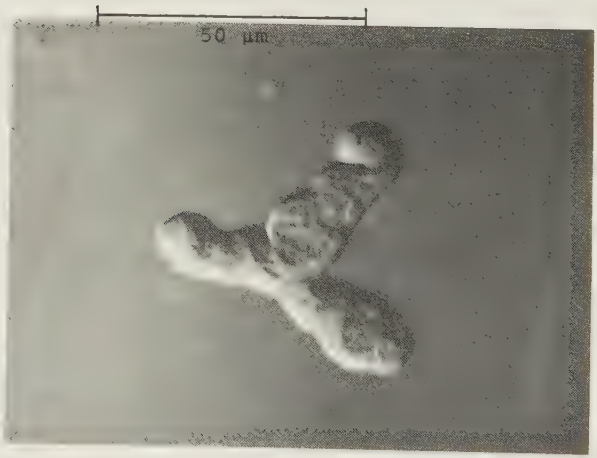
Mit der angegebenen Isolierungsmethode erhält man normalerweise eine Zellsuspension mit mindestens 50% langgestreckten, nicht spontanaktiven Vorhofzellen. Die Zellen lassen eine deutliche Querstreifung erkennen und weisen, soweit lichtmikroskopisch sichtbar, keine Schädigungen auf. Die Zellen können unter Beachtung der genannten Punkte leicht in physiologische Lösungen überführt werden, ohne daß eine Schädigung der Zellen eintritt. Abb. 5 A zeigt eine Interferenzphasenkontrastaufnahme solcher Vorhofzellen, die unmittelbar nach der Isolierung in normaler Tyrodelösung aufgenommen wurden. Die Zellen haben einen Durchmesser von ca. 6-8 µm und eine Länge von 150-300 µm. Die durchschnittliche Sarkomerlänge beträgt ca. 2 µm, d.h. die Zellen befinden sich in einem relaxierten Zustand.

Neben den langgestreckten, als intakt identifizierten Zellen enthalten die Suspensionen eine unterschiedliche Anzahl stark kontrahierter, oftmals spontanaktiver Zellen, die keine Querstreifung erkennen lassen und eine unregelmäßige Gestalt mit Membranblasen aufweisen. Diese offensichtlich geschädigten Zellen heften sich unter Kulturbedingungen nicht an den Boden der Gewebeschalen an und zerfallen nach wenigen Tagen.

Die intakten Vorhofzellen heften sich während der ersten 24 Stunden in Zellkultur am Boden der Gewebeschalen an, bekommen glatte Ränder und verkürzen sich zunehmend. Abb. 5 B zeigt solche teilweise verkürzten Zellen in der Kultur ca. 20 Stunden nach der Isolierung. Die Querstreifung der Zellen ist zu



A



B

Abb. 5: Vorhofzellen unmittelbar nach der Isolierung in normaler Tyrodelösung (A) und nach 24 Stunden in der Zellkultur (B).

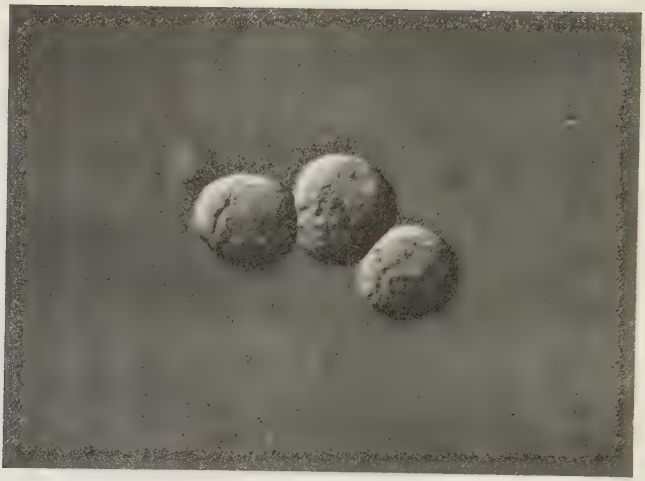
diesem Zeitpunkt nicht mehr sichtbar. Oftmals lassen sich auf der Zelloberfläche pockenartige Erhebungen erkennen, die sich im Verlauf der nächsten Stunden wieder zurückbilden.

Nach 2-3 Tagen in Kultur haben sich die Zellen weiter abgerundet und besitzen eine nahezu kugelförmige Gestalt mit einem Durchmesser von 10-30 µm (Abb. 6 A). Der Innenraum der Zellen erscheint unter dem Lichtmikroskop bei einigen Zellen vollkommen strukturlos, bei anderen lassen sich vakuolenartige Strukturen erkennen, die im Extremfall die gesamte Zelle einzunehmen scheinen. Aufgrund ihrer kugelförmigen Gestalt und in Analogie zu den Myoballs - embryonalen Skelettmuskelzellen in Kultur (Sachs & Lecar, 1977; Horn & Brodwick, 1980) - wurde für diese Zellen die Bezeichnung "Cardioballs" gewählt.

In der nächsten Entwicklungsstufe, die nach ca 5-7 Tagen einsetzt, beginnen sich die Zellen, ausgehend von der Anheftungsstelle, abzuflachen. Sie bilden eine Fibroblasten-ähnliche Gestalt mit geringer Tiefe und unregelmäßiger Form aus (Abb. 6 B). In dieser Phase ähneln die Zellen in ihrer Erscheinung embryonalen Herzmuskelzellen in Kultur. In den abgeflachten Zellen lassen sich häufig Bereiche mit deutlicher Querstreifung erkennen. Während der Abflachung kommt es also offensichtlich zu einer teilweisen Neuordnung der Myofilamente.

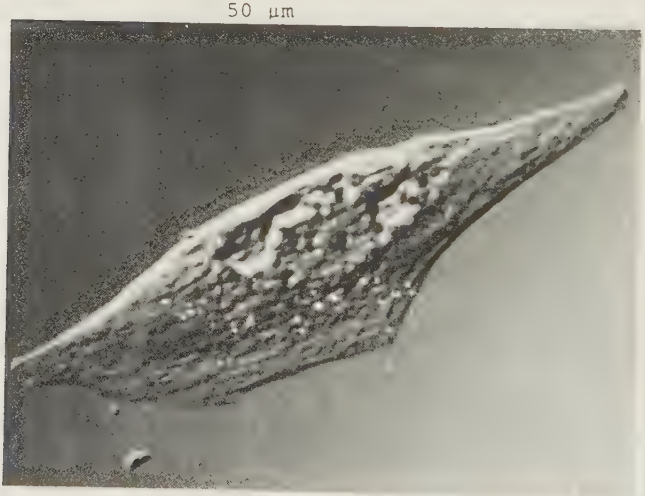
Mit der morphologischen Umgestaltung der Zellen sind offenbar auch physiologische Veränderungen verknüpft. So steigt der Anteil spontanaktiver Zellen im Verlauf der ersten Tage nach der Isolierung kontinuierlich an, bis nahezu alle Zellen spontane Kontraktionen erkennen lassen. Wenn die Zelldichte in den Kulturschalen ausreichend hoch ist und einzelne Zellen nur wenig voneinander entfernt sind, so bilden benachbarte Zellen Ausläufer, die aufeinander zuwachsen und schließlich Zell-zu-Zellkontakte herstellen. Dadurch sind benachbarte Zellen wieder elektrisch gekoppelt und zeigen synchronisierte Spontanaktivität.

Die Zellen können in diesem Stadium über Monate in Kultur gehalten werden.



A

50 µm



B

50 µm

Abb. 6: Vorhofzellen 3 Tage (A; "Cardioballs") und 7 Tage (B) nach der Isolierung in Zellkultur.

2. Elektrophysiologische Eigenschaften der frisch isolierten Zellen

Isolierte Herzzellen dienen erst seit kurzem als Versuchsobjekte für elektrophysiologische Untersuchungen (vgl. u.a. Powell et al., 1980; Isenberg & Klöckner, 1980, 1982 a, b, c; Hume & Giles, 1981, 1983). Sie bieten im Vergleich zu multizellulären Gewebepräparaten wesentliche Vorteile: 1. Die geringe Zellgröße und der damt verbundene hohe Zelleingangswiderstand erlauben eine einfache und exakte Durchführung von Spannungsklemmversuchen. 2. Akkumulations- bzw. Depletionsvorgänge, d.h. nicht kontrollierbare Änderungen der Ionengradienten aufgrund enger Extrazellularräume beim Gewebepräparat (vgl. z.B. Baumgarten & Isenberg, 1977), können weitgehend ausgeschlossen werden. 3. Untersuchungen zur Wirkung vegetativer Transmitter werden nicht durch Gewebeeinflüsse (z.B. verzögerte Diffusion durch unspezifische Bindung) überlagert. 4. Die Zusammensetzung der intrazellulären Lösung kann kontrolliert und verändert werden. 5. Isolierte Zellen bieten sehr gute Voraussetzungen für Einzelkanaluntersuchungen mit der verbesserten Patch-clamp-Technik.

Die physiologische Relevanz der an Einzelzellen gewonnenen Ergebnisse wird weitgehend von der Übertragbarkeit auf die Verhältnisse in situ bestimmt. Es muß von daher geprüft werden, inwieweit die physiologischen Eigenschaften der Einzelzellen durch die enzymatische Isolierung geschädigt oder verändert wurden. Für isolierte Ventrikelzellen verschiedener Spezies (Isenberg & Klöckner, 1982 a, b, c), AV- und Sinusknotenzellen des Kaninchens (Taniguchi et al., 1981) und für Froschvorhofzellen (Hume & Giles, 1981, 1983) konnte gezeigt werden, daß die isolierten Zellen in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften mit herkömmlichen Gewebepräparaten vergleichbar sind. Über Messungen an isolierten Vorhofzellen des Säugers liegen bisher mit Ausnahme einer Kurzmitteilung (Belardinelli & Isenberg, 1983) keine Publikationen vor.

Die im folgenden dargestellten Untersuchungen an den frisch isolierten Vorhofzellen geben eine erste Bestandsaufnahme der

elektrophysiologischen Eigenschaften wieder. Es wurden ausschließlich Spannungsmessungen mit der verbesserten Patch-clamp-Technik unter WCR-Bedingungen durchgeführt. Spannungsmessungen in dieser Ableitkonfiguration unterscheiden sich in elektrischer Hinsicht nicht von herkömmlichen Mikroelektrodenableitungen. Im Unterschied zu herkömmlichen Mikroelektroden erlauben Patchpipetten jedoch eine einfache Ableitung von Einzelzellen, ohne daß es zu einer irreversiblen Schädigung der Zellen kommt. Die beim konventionellen Mikroelektrodeneinstich zu beobachtende Depolarisation sowie der kurzzeitige, starke Ca-Einstrom (vgl. u.a. Powell et al., 1980; Taniguchi et al., 1981) können mit der Patch-clamp-Technik vermieden werden, da die Zellmembran unter der Öffnung der Patchpipette erst dann zerstört wird, wenn sich der hohe Abdichtwiderstand ausgebildet hat. Das Zellinnere kommt daher nur mit der Lösung der Patchpipette in Kontakt, deren freie Ca-Konzentration in diesen Experimenten durch Zugabe von 1 mM EGTA auf 10^{-8} M erniedrigt wurde.

Da in diesen ersten Versuchen die unveränderten elektrischen Eigenschaften der Zellen bestimmt werden sollten, wurden nur relativ hochohmige Patchpipetten (10-20 MΩ) verwendet, um einen schnellen Austausch der intrazellulären Lösung zu verhindern. Eine Dialyse des Zellinneren konnte aber nicht vollständig vermieden werden. Wichtige Kontrollmessungen erfolgten daher unmittelbar nach Beginn der Ableitung.

Vorhofzellen halten normalerweise unter physiologischen Bedingungen ein stabiles Ruhepotential aufrecht (vgl. Sperelakis, 1979). Auch in den isolierten Vorhofzellen kann bei einer stabilen Ableitung ein konstantes Ruhepotential von über -70 mV (Mittelwert -75 $\pm$ 3,5 mV) gemessen werden. Spontanaktive Zellen weisen ähnlich den Schrittmacherzellen kein stabiles Ruhepotential, sondern eine diastolische Depolarisation mit einem maximalen diastolischen Potential von -40 bis -50 mV auf. Im Vergleich zum Gewebepräparat ist das Ruhepotential der isolierten Zellen einer höheren Variabilität unterworfen, da eine elektrotonische Wechselwirkung zwischen den Zellen nicht mehr vorhan-

den ist.

Neben dem Ruhepotential ist besonders die Größe und Form des Aktionspotentials ein Merkmal einer geordneten elektrischen Aktivität. Die einzelnen Phasen ermöglichen einen ersten Rückschluß auf die Funktion der beteiligten Stromsysteme. In Abb. 7 sind verschiedene Typen von registrierten Aktionspotentialen dargestellt. Die initiale, schnelle Aufstrichsphase, ausgelöst durch den schnellen Na-Einstrom, ist bei allen Aktionspotentialen identisch. Die maximale Aufstrichsgeschwindigkeit beträgt 200-300 V/ s; für die Amplitude des Aktionspotentials wurden in Abhängigkeit vom Ruhepotential Werte von über 100 mV bestimmt.

Die unterschiedliche Form der abgeleiteten Aktionspotentiale wird maßgeblich durch die Repolarisation während der Plateauphase bestimmt. In diesem Bereich entsteht durch die Überlagerung von repolarisierenden K-Auswärtsströmen und dem aktivierten langsamen Einwärtsstrom (Ca-Einstrom, I_{si}) ein empfindliches Gleichgewicht, das für die Dauer und die Form des resultierenden Aktionspotentials verantwortlich ist. Sowohl die Kaliumleitfähigkeit als auch der Ca-Einstrom selbst werden durch die Höhe der intrazellulären Ca-Konzentration (Ca_i) beeinflußt (Isenberg, 1977 a, b, c; Reuter, 1983). Veränderungen von Ca_i sollten daher einen direkten Einfluß auf die Dauer und den Verlauf des Aktionspotentials haben (vgl. Kass & Tsien, 1976). Dies konnte in den Versuchen bestätigt werden.

Wenn Pipettenlösungen mit Ca-Konzentrationen von 10-20 µM verwendet werden, findet man ein stark verkürztes Aktionspotential ohne Plateauphase mit einer Dauer (gemessen bei 90% Repolarisation) von 20-50 ms. Bei der Verwendung von Pipettenlösungen, deren freie Ca-Konzentration durch den Zusatz von 1 mM EGTA erniedrigt wurde, findet man angenähert physiologische Aktionspotentiale mit einer Dauer von 150-250 ms (Abb. 7, mittleres Aktionspotential). Eine weitere Absenkung der freien, intrazellulären Ca-Konzentration durch die Verwendung einer 140 mM K-Citratlösung zum Füllen der Patchpipetten resultiert in einer drastischen Verlängerung der Aktionspotentialdauer. Diese Verlängerung kann durch die Badapplikation von 10^{-6} M Adrenalin wieder aufgehoben werden. Als Folge des unter Adrena-

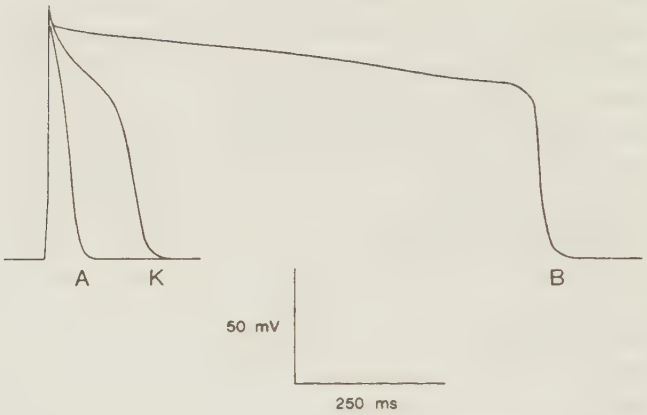


Abb. 7: Vergleich verschiedener Aktionspotentiale der frisch isolierten Vorhofzellen. Unmittelbar nach Herstellung der WCR-Ableitung (Kontrollbedingung) gleicht das Aktionspotential (K) denen, die am Gewebepräparat registriert werden (freie Ca-Konzentration der Pipettenlösung durch Zugabe von EGTA auf ca. 10^{-7} M erniedrigt). Wird die Zelle mit einer Pipettenlösung dialysiert, die eine höhere Ca-Konzentration aufweist, so werden stark verkürzte Aktionspotentiale (A) beobachtet. Bei niedrigeren Ca-Konzentrationen der Pipettenlösung (140 mM K-Citrat; freie Ca-Konzentration $<10^{-8}$ M) kommt es zu einer deutlichen Verlängerung des Aktionspotentials (B).

lineinfluß verstärkten Ca-Einstroms nimmt die Dauer des Aktionspotentials wieder auf den Kontrollwert (in Abb. 7, mittleres Aktionspotential) ab.

Im weiteren wurden auch der Zelleingangswiderstand (r_m) und die Zellkapazität der Vorhofzellen untersucht. Der Zelleingangswiderstand ergibt sich nach dem Ohmschen Gesetz aus der Spannungsänderung bei Reizung mit Strompulsen konstanter Amplitude. Die exponentielle Zeitkonstante (τ_m) der Spannungsänderung ist dabei gleich dem Produkt aus r_m und c_m. Die Mittelwerte von zehn verschiedenen Zellen sind in Tab. 2 zusammen mit den übrigen elektrischen Parametern aufgeführt.

Aus der Gesamtkapazität der Zellmembran (von 33,2 ± 10,9 pF) kann unter der Annahme einer spezifischen Membrankapazität von 1 µF/cm^2 (vgl. z.B. Weidmann, 1974) die Membranfläche der Zelle auf 3,3 10^{-5} cm^2 abgeschätzt werden. Dieser Wert korreliert gut mit den geometrischen Abschätzungen der Zellmembranfläche von ca. 2-5 10^{-5} cm^2; dabei wurde eine zylinderförmige Geometrie (Länge 100-300 µm, Durchmesser 7 µm) zugrunde gelegt. Bezogen auf die kapazitiv ermittelte Membranfläche der Zellen kann ein spezifischer Membranwiderstand von 7,95 10^3 Ω cm^2 bestimmt werden; dieser Wert stimmt mit bisher veröffentlichten Untersuchungen überein (vgl. Isenberg & Klöckner, 1982 a: 7,2 ± 1 10^3 Ωcm^2; Hume & Giles, 1981: 7,9 ± 1,2 10^3 Ωcm^2).

Tabelle 2: Elektrische Eigenschaften der frisch isolierten Vorhofzellen (N=10; Mittelwerte ± Standardabweichung; die kapazitive Membranfläche und der spezifische Widerstand sind aus den entsprechenden Mittelwerten berechnet worden)

Ruhepotential	-75 ± 3,5 mV
Amplitude des Aktionspotentials	103 ± 11,4 mV
Dauer des Aktionspotentials (bei 90% Repolarisation)	112 ± 38 ms
maximale Aufstrichsgeschwindigkeit	240 ± 62 V/s
Zelleingangswiderstand (r_m)	241 ± 106 MΩ
Membranzeitkonstante (τ_m)	9,3 ± 3,6 ms
Zellmembrankapazität (c_m)	33 ± 11 pF
Membranfläche (bei angenommener spezifischer Membrankapazität von 1 µF/cm^2)	3,3 10^{-5} cm^2
spezifischer Membranwiderstand	7,95 10^3 Ωcm^2

Beim Vergleich der elektrischen Eigenschaften der isolierten Vorhofzellen mit denen der Säugerventrikel- (Isenberg & Klöckner, 1982 a) und Froschvorhofzellen (Hume & Giles, 1981) läßt sich eine grundsätzliche Übereinstimmung feststellen. Abweichungen zu den Ventrikelzellen ergeben sich aus der um etwa 10-fach geringeren Zellgröße der Vorhofzellen und den daraus resultierenden Unterschieden beim Eingangswiderstand und der Zellkapazität. Aufgrund der annähernd gleichen geometrischen Abmessungen läßt sich der Eingangswiderstand eher mit dem der Froschvorhofzellen vergleichen (Hume & Giles, 1981: $r_m = 219{,}8 \pm 77{,}4$ MΩ).

Von besonderem Interesse ist auch die Frage nach einer möglichen Schädigung der Rezeptorstrukturen der Zellen durch die enzymatische Behandlung. Um diese Frage zu klären, wurde die Wirkung von Acetylcholin (ACh) näher untersucht. ACh ruft am Vorhof-, Sinus- und AV-Knotengewebe über eine Bindung an muskarinergen Rezeptoren eine Leitfähigkeitserhöhung für K-Ionen hervor (Harris & Hutter, 1956; Trautwein & Dudel, 1958; Glitsch & Pott, 1978). Auch an isolierten Vorhofzellen lassen sich die typischen Merkmale einer muskarinergen ACh-Antwort beobachten:

1. In Gegenwart von 10^{-6} M ACh ist der Zelleingangswiderstand im untersuchten Spannungsbereich deutlich reduziert, wie in Abb. 8 dargestellt wird. In der Abbildung ist der Membranwiderstand, der durch hyperpolarisierende Ströme unterschiedlicher Amplitude bestimmt wurde, jeweils gegen die resultierende steady-state Spannung aufgetragen.
2. Durch ACh-Ionophoresepulse lassen sich je nach Lage der Membranspannung Hyper- und Depolarisationen auslösen, die in ihrem zeitlichen Verlauf denen am Gewebepräparat vergleichbar sind (Osterrieder et al., 1981; Bechem et al., 1981). In Abb. 8 wird gezeigt, daß auf ACh-Freisetzung am Ruhepotential eine Hyperpolarisation und bei Spannungen negativer als E_K eine Depolarisation erfolgt. Der Antwortverlauf ist bei Einzelzellen aufgrund der günstigen geometrischen Verhältnisse und der damit verbundenen kür-

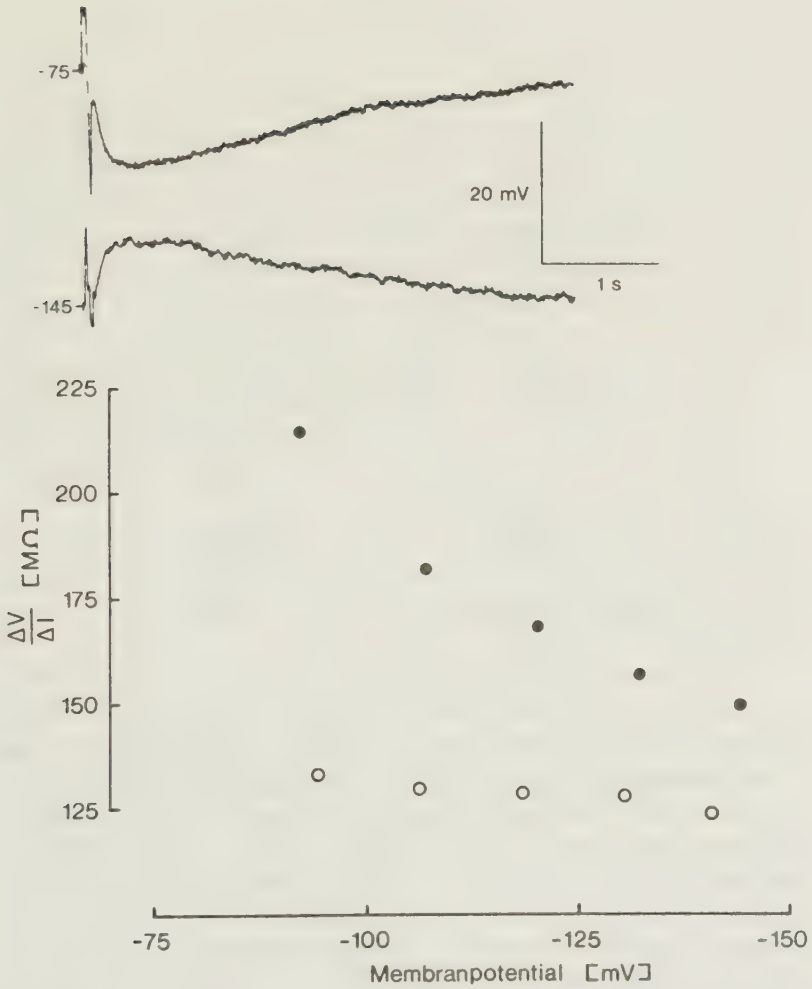


Abb. 8: Die Wirkung von ACh auf das Membranpotential (oben) und den Eingangswiderstand (unten) der Zellen. Durch kurze ACh-Ionophoresepulse (Dauer 20 ms) kann bei Spannungen positiver als E_K (2 mM K_o, E_K = -108 mV) eine Hyperpolarisation und bei negativeren eine Depolarisation der Membran mit ähnlichem zeitlichen Verlauf ausgelöst werden. Die untere Abbildung zeigt, daß der Eingangswiderstand in Gegenwart von 10^{-6} M ACh (o) im untersuchten Spannungsbereich deutlich gegenüber der Kontrolle (•) reduziert ist.

zeren Diffusionswege um einen Faktor 3-5 schneller als am Gewebepräparat.

3. Die ACh-bedingte Antwort ist durch den kompetitiven Antagonisten des muskarinergen Rezeptors Atropin hemmbar. Abb. 9 zeigt dies an einem Versuch, in dem durch ionophoretische Freisetzung von ACh während des Aktionspotentials (der Zeitpunkt der Freisetzung ist an den Reizartefakten erkennbar) eine schnelle Repolarisation ausgelöst wird (in Abb. 9 verkürztes Aktionspotential). Durch Zugabe von 10^{-7} M Atropin kann die Wirkung des ACh vollständig aufgehoben werden, so daß das Aktionspotential - bis auf die noch erkennbaren Reizartefakte - wieder einen normalen Verlauf zeigt (in Abb. 9 ist das Aktionspotential unter Kontrollbedingungen mit dem in Gegenwart von Atropin identisch).

Wichtige elektrophysiologische Eigenschaften der isolierten Vorhofzellen sind, wie die dargestellten Ergebnisse unterstreichen, durch die enzymatische Isolierung offenbar nicht wesentlich verändert worden.

Da im weiteren insbesondere die Beschreibung verschiedener K-Ströme im Vordergrund steht, soll an dieser Stelle noch kurz auf die Wirkung von Ba-Ionen eingegangen werden, wie sie sich in der Spannungsableitung darstellt. In der Literatur werden Ba-Ionen als spezifischer Hemmstoff von einwärtsgleichrichtenden K-Strömen beschrieben (u.a. Hagiwara et al., 1978; Standen & Stanfield, 1978; Ohmori et al., 1981). Am Herzen kommt es in Gegenwart von Ba-Ionen zu einer Depolarisation der Membran, der Membranwiderstand steigt an, und es entsteht Spontanaktivität (Antoni & Oberdisse, 1965; Reid & Hecht, 1967; Glitsch et al., 1982; Osterrieder et al., 1982b).

In Abb. 10 wird der Effekt von 0,2 mM $BaCl_2$ auf das Membranpotential einer isolierten Vorhofzelle dargestellt. Wie erwartet depolarisiert das Membranpotential (um ca. 34 mV im gezeigten Versuch), und die Zelle wird spontanaktiv. Dabei nimmt der Zelleingangswiderstand von 220 auf 380 MΩ zu, was auf die Blockierung einer Ruheleitfähigkeit hindeutet. Auch in bezug auf die Wirkung von Ba-Ionen lassen isolierte Zellen keine Unterschiede zu herkömmlichen Gewebepräparaten erkennen.

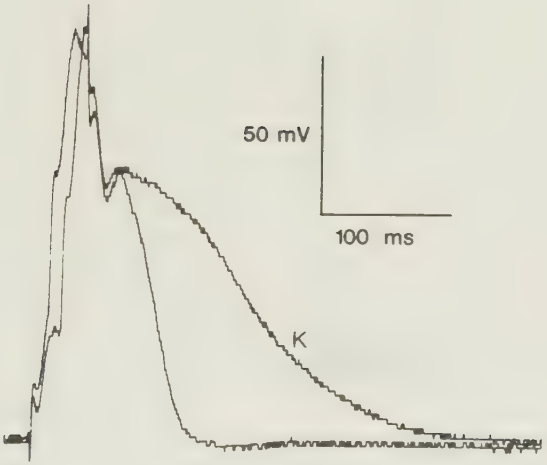


Abb. 9: Der Einfluß von ACh auf den Verlauf des Aktionspotentials. Ein ACh-Ionophoresepuls, ausgelöst während der Aufstrichphase des Aktionspotentials, führt zu einer Reduzierung der Aktionspotentialdauer (verkürztes Aktionspotential). Nach Zugabe von Atropin (Endkonzentration im Bad 10^{-7} M) bleibt ein Ionophoresepuls mit identischer Dauer und Amplitude ohne Einfluß auf das Aktionspotential (K). Die Reizartefakte kennzeichnen den Zeitpunkt und die Dauer (20 ms) des Ionophoresepulses.

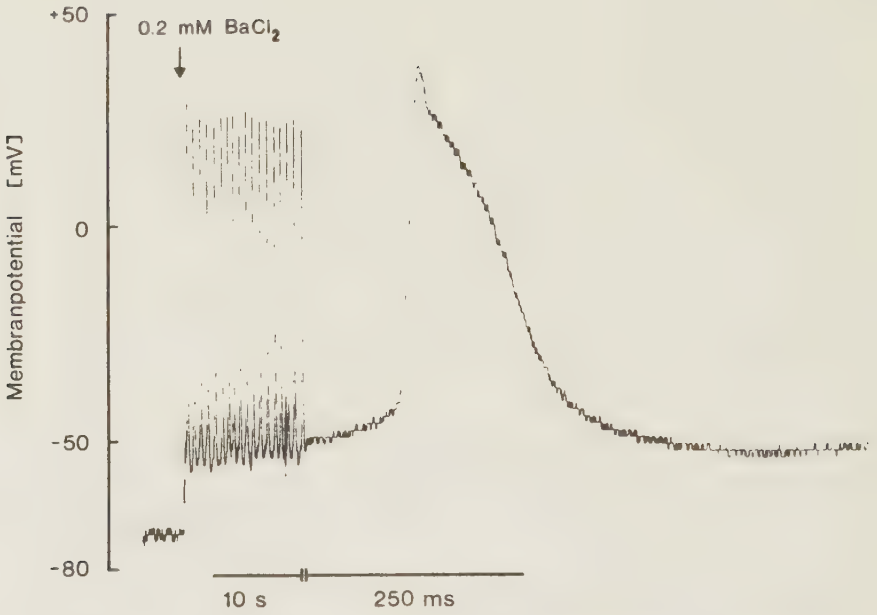


Abb. 10: Wirkung von 0,2 mM $BaCl_2$ auf das Membranpotential einer isolierten Vorhofzelle. Nach Wechsel auf Ba-haltige Lösung (2 mM K_o) depolarisiert die Zelle um ca. 34 mV und wird spontanaktiv.

3. K-Ströme in kultivierten Vorhofzellen

Die Vorteile von isolierten, adulten Herzzellen als elektrophysiologische Untersuchungsobjekte sind bereits ausführlich dargestellt worden. Bei den Experimenten mit diesen Zellen ergaben sich jedoch einige Schwierigkeiten, die ihre Eignung als Untersuchungsobjekte für elektrophysiologische Messungen einschränken: 1. Die für Patch-clamp-Versuche ungünstige Gestalt der Vorhofzellen mit einer Länge von 150-300 µm und einem Durchmesser von ca. 7 µm erschwert das einwandfreie Aufsetzen der Patchpipetten. Dies führt zu einer Reduzierung der Erfolgsrate bei der Ausbildung des hohen Abdichtwiderstands. 2. Die Gestalt der Vorhofzellen ermöglicht im Zusammenhang mit dem relativ niedrigen Eingangswiderstand die Durchführung von Spannungsklemmversuchen mit einer Elektrode nur unter günstigsten Voraussetzungen. In vielen Fällen kann keine ausreichende Homogenität und Stabilität der Klemmspannung erzielt werden. 3. Kontraktionen der länglichen Zellen beeinträchtigen die Stabilität der Ableitung. 4. Die frisch isolierten Zellen sind in der Badlösung frei beweglich. Sie können nur mit Schwierigkeiten mit den Patchpipetten fixiert werden. Eine Herstellung von zellfreien Membranpatchableitungen ist weitgehend unmöglich, da sich beim Abziehen der Pipetten die gesamte Zelle mit anhebt. 5. Ein weiterer Nachteil frisch isolierter Herzzellen besteht schließlich darin, daß die kosten- und zeitaufwendige Zellisolierung zu Beginn eines Versuchs täglich erneut durchgeführt werden muß.

Alle diese Schwierigkeiten können durch die Kultivierung der Vorhofzellen behoben werden. Die Cardioballs erlauben aufgrund ihrer nahezu kugelförmigen Gestalt und dem hohen Zelleingangswiderstand die Durchführung von Spannungsklemmen mit einer Elektrode. Die kugelförmige Gestalt und die feste Anheftung am Boden der Kulturschalen bieten günstige Voraussetzungen für die Anwendung der verschiedenen Ableitkonfigurationen der verbesserten Patch-clamp-Technik. Darüber hinaus können von einem Vorhof ca. 20-30 Kulturen mit hinreichender Zelldichte herge-

stellt werden, die über einen Zeitraum von ca. 10 Tagen für Experimente verwendbar sind. Da die Cardioballs auch in Zellkultur wesentliche Eigenschaften der Herzmuskelzelle, wie einwärtsgleichrichtende K-Ströme, den schnellen Na-Strom, Empfindlichkeit für ACh, Spontanaktivität usw., besitzen, scheinen sie als elektrophysiologisches Untersuchungsobjekt der Herzphysiologie gut geeignet zu sein.

In den folgenden Abschnitten werden die Spannungsklemmuntersuchungen an den kultivierten Vorhofzellen mit den Ableitkonfigurationen WCR, CAP und OSOP vorgestellt. Dabei steht die Beschreibung der steady-state K-Ströme im Vordergrund. In vielen Fällen konnte sukzessiv an einer Zelle in den drei verschiedenen Konfigurationen abgeleitet werden, so daß ein direkter Vergleich der Ergebnisse unter verschiedenen Ableitbedingungen möglich wurde. Aus Gründen einer übersichtlichen Darstellung werden die verschiedenen Ableitkonfigurationen jedoch in getrennten Abschnitten behandelt. Zu Beginn steht die Darstellung der K-Ströme an der gesamten Zelle in der WCR-Ableitung sowie eine kurze Charakterisierung anderer elektrophysiologischer Eigenschaften der Cardioballs. Anschließend werden diese Ergebnisse mit Einzelkanaluntersuchungen in der CAP- und OSOP-Ableitung verglichen.

Eine erste Charakterisierung der verschiedenen Membranströme einer elektrisch erregbaren Zelle kann durch die Aufnahme einer steady-state Stromspannungsbeziehung erfolgen. Derartige Gleichgewichts-Stromspannungsbeziehungen von Herzmuskelpräparaten zeigen unterschiedliche Verläufe, abhängig von der Herzregion, der das Präparat entnommen wurde, und von den gegebenen Versuchsbedingungen (vgl. Carmeliet & Vereecke, 1979). Diese Stromspannungsbeziehungen geben ersten Aufschluß über Größe und Richtung der unter steady-state Bedingungen vorhandenen Netto-Membranströme. Sie ermöglichen die Bestimmung des Zelleingangswiderstands sowie des Nullstrompunkts, der dem jeweiligen Ruhepotential der Zelle entspricht. Gemeinsame Merkmale dieser Stromspannungsbeziehungen am Herzen sind der sigmoide oder N-förmige Verlauf im Membranpotentialbereich von -60 bis -20 mV

mit der Ausprägung eines hohen bzw. negativen Widerstands in diesem Potentialbereich.

In Abb. 11 sind die steady-state Stromspannungsbeziehungen der Cardioballs bei zwei verschiedenen, extrazellulären K-Konzentrationen (K_o) dargestellt. Die Stromspannungsbeziehungen wurden aufgenommen, indem die Klemmspannung rampenförmig mit konstanter Geschwindigkeit (1,5 mV/s) in depolarisierender Richtung im dargestellten Spannungsbereich variiert wurde. Es muß dabei berücksichtigt werden, daß Ströme mit Zeitkonstanten von mehreren sec keinen Gleichgewichtszustand erreichen. Die meisten Ströme mit Zeitkonstanten unterhalb 1 s können jedoch zu jedem Zeitpunkt als konstant bzw. dauernd inaktiviert (I_{Na}) angesehen werden.

Die steady-state Stromspannungsbeziehung der Cardioballs wird ähnlich wie bei anderen Herzpräparationen maßgeblich von der K_o bestimmt. Bei 2 mM (Abb. 11: flache Kurve) erhält man im gesamten Spannungsbereich einen flachen Kurvenverlauf mit einem leichten Anstieg bei positiven Membranspannungen. Der Zelleingangswiderstand, bestimmt aus der Steigung der Kurve, erreicht im flachen Teilstück einen Wert von ca. 3 GΩ . Das Ruhepotential dieser Zelle lag unter den gegebenen Bedingungen bei -20 mV. Allgemein wiesen die Cardioballs eine hohe Variabilität im Ruhepotential (im Bereich von -20 bis -70 mV) auf. Dies ist eine unmittelbare Folge des hohen Zelleingangswiderstands der Zellen, da kleine Stromveränderungen ausreichen, das Ruhepotential in die eine oder andere Richtung zu verschieben.

Bei einer auf 20 mM erhöhten K_o wird das Kaliumgleichgewichtspotential auf ca. -50 mV verschoben. Die resultierende Stromspannungsbeziehung (Abb. 11: Kurve mit deutlich verstärktem Einwärtsstrom) zeigt bei Spannungen positiver als E_K nur eine geringfügige Veränderung, bei negativerem Membranpotential hingegen wird eine deutliche Zunahme des Einwärtsstroms sichtbar. Der Steigungswiderstand beträgt in diesem Bereich etwa 200 MΩ . Ein direkter Vergleich der in Abb. 11 dargestellten Kurven ist jedoch nicht möglich, da es sich um Ableitungen von verschiedenen Zellen handelt. Eine Aussage über eine eventuelle Veränderung des Ruhepotentials in Gegenwart erhöhter K_o kann

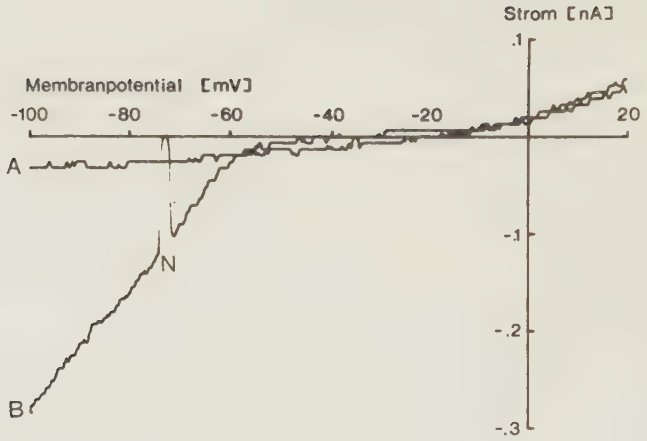


Abb. 11: Stromspannungskurven in 2 (A) und 20 (B) mM K_o (Aufnahmen von zwei verschiedenen Zellen). Die Stromspannungskurven wurden unmittelbar nach Herstellung der WCR-Ableitung (Kontrollbedingung) mit einer Rampenspannung in depolarisierender Richtung aufgenommen (Geschwindigkeit 1,5 mV/s). In Kurve B wurde zum Zeitpunkt N kurzzeitig die Lage der Nullinie geprüft.

wegen der Variabilität nicht abgeleitet werden.

Die in Abb. 11 dargestellten Stromspannungsbeziehungen wurden jeweils zu Beginn einer Ableitung, d.h. unmittelbar nach Herstellung der WCR-Ableitkonfiguration, aufgenommen; sie geben damit die Kontrolle wieder, da die Zusammensetzung der intrazellulären Lösung zu diesem Zeitpunkt noch weitgehend unverändert ist. Bei längerer Ableitung wird die Zelle jedoch mit der Pipettenlösung (140 mM KCl, 10mM HEPES-NaOH pH 7,2) dialysiert, und es kommt zu einer Folge typischer Veränderungen in den Membranströmen. In Abb. 12 A wird dies an einer Ableitung in 2 mM K_o verdeutlicht. Unmittelbar zu Beginn der Registrierung wurde Kurve A (Kontrolle) aufgenommen; sie zeigt den für Cardioballs charakteristischen Verlauf mit einem Ruhepotential von -20 mV.

Innerhalb der folgenden Minuten kommt es zu einer kontinuierlichen Verschiebung der Stromspannungsbeziehung in Auswärtsrichtung.Dabei nimmt zunächst nur der Auswärtsstrom bei positiven Spannungen zu, während sich der übrige Kurvenverlauf nur wenig ändert (Kurve B). Mit Spannungssprüngen (Abb. 12) kann gezeigt werden, daß der induzierte Auswärtsstrom während dieser Phase eine zeit- und spannungsabhängige Aktivierung zeigt und damit dem an verschiedenen Herzpräparaten beschriebenen verzögerten Gleichrichter ähnelt (Purkinjefaser: Noble & Tsien, 1969; Ventrikel der Katze: Mc Donald & Trautwein, 1978; Sinusknotenzellen des Kaninchens: Noma & Irisawa, 1976). In dieser Phase der Ableitung erreichen die Membranströme bei der gewählten Rampengeschwindigkeit kein echtes Gleichgewicht. Dies wurde aufgrund der Hysterese der Stromspannungskurven bei einer Umkehr der Rampenspannung sichtbar.

Mit zunehmender Dauer der Ableitung verschwindet die zeitabhängige Inaktivierung des Auswärtsstroms wieder. Die Stromspannungsbeziehung (Kurve C) ist nun auch bei negativen Spannungen deutlich in Auswärtsrichtung verschoben. Sie zeigt bis ca. -20 mV einen linearen Verlauf, erreicht ein Maximum und nimmt bei positiveren Spannungen wieder leicht ab. Der Nullstrompunkt ist im Verlauf der Ableitung in negative Richtung

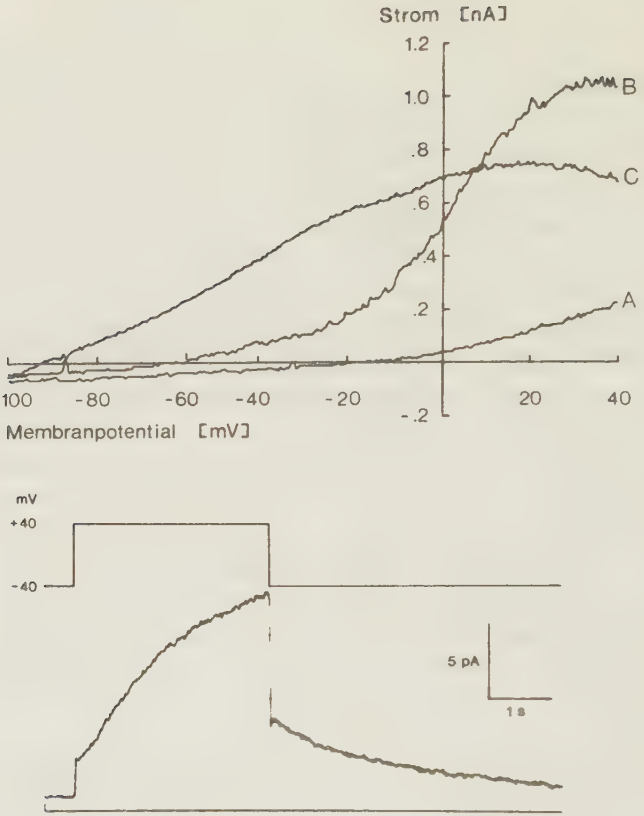


Abb. 12: Typische Veränderungen der Stromspannungskurven (oben; aufgenommen wie in Abb. 11), wenn die Zelle mit der Pipettenlösung (140 mM KCl, 10 mM HEPES-NaOH pH 7,2, nominell Ca-frei) dialysiert wird. Die Stromspannungskurve wird ausgehend von der Kontrolle (Kurve A, unmittelbar zu Beginn der Ableitung aufgenommen) zunehmend in Auswärtsrichtung verschoben (Kurve B 300 s und Kurve C 400 s nach Beginn der Ableitung registriert). Unten wird am Beispiel einer Originalregistrierung aus einem anderen Experiment dargestellt, daß der untersuchte K-Strom während der Induzierung (vgl. Kurve B in der oberen Abb.) ein zeitabhängiges Verhalten besitzt. Bei einem depolarisierenden Spannungsschritt von -40 auf +40 mV wird die Aktivierung und bei Repolarisation die Inaktivierung eines Auswärtsstroms beobachtet. Die eingezeichnete Gerade kennzeichnet I = 0.

verschoben worden. Der Verlauf der Stromspannungskurve zeigt die charakteristischen Merkmale der Einwärtsgleichrichtung am Herzen mit einer Zunahme des Membranwiderstands bei zunehmender Depolarisation. Der Verlauf der Kurve zeigt Ähnlichkeit mit der vollaktivierten Stromspannungsbeziehung des verzögerten Gleichrichters (Noble & Tsien, 1969).

Das Ruhepotential und die Zunahme eines einwärtsgleichrichtenden Auswärtsstroms legen die Vermutung nahe, daß es sich bei diesem Strom um einen K-Strom handelt, der durch die Veränderung des intrazellulären Milieus induziert wird. Dies wird dadurch bestätigt, daß der induzierte Strom in Ba-haltigen Lösungen spannungsabhängig blockiert wird. Abb. 13 zeigt den Effekt von 0,2 mM $BaCl_2$ auf den Verlauf der Stromspannungsbeziehung. Besonders im Bereich negativer Spannungen nimmt der Auswärtsstrom deutlich ab. Bei positiven Spannungen kommt es zu einer zeitabhängigen Aufhebung des Ba-Blocks, wie die Hysterese am rechten Rand in Abb. 13 bei einer Umkehrung der Rampenspannung verdeutlicht. Ein ähnliches Verhalten von Ba-Ionen ist bei der Blockierung von einwärtsgleichrichtenden K-Strömen am Skelettmuskel beschrieben worden (Standen & Stanfield, 1978).

In der letzten Phase der Ableitung nach ca. 15-30 Minuten findet eine zunehmende, irreversible Abnahme des induzierten K-Stroms statt, gleichzeitig nehmen unspezifische Einwärtsströme zu. Die Zelle depolarisiert, der Eingangswiderstand sinkt aufgrund entstehender Leckleitfähigkeiten auf niedrige Werte ab, und die Stromspannungsbeziehung weist einen vollständig linearen Verlauf mit einem Nullstrompunkt von 0 mV auf.

Der oben beschriebene K-Strom wird entweder durch einen Faktor der Pipettenlösung oder durch den Wegfall einer intrazellulären Komponente, die den Strom normalerweise inaktiviert, induziert. Da insbesondere Ca-Ionen eine K-Leitfähigkeitserhöhung bewirken können (Isenberg, 1977 a-d), wurden Versuche mit EGTA-haltigen (1mM) Pipettenlösungen durchgeführt (freie Ca-Konzentration $\leq 10^{-8}$ M). Es zeigte sich, daß unter diesen Bedingungen hochohmige Abdichtwiderstände schwieriger zu erreichen waren und die Pipetten bei der Ganzzellableitung sehr häufig

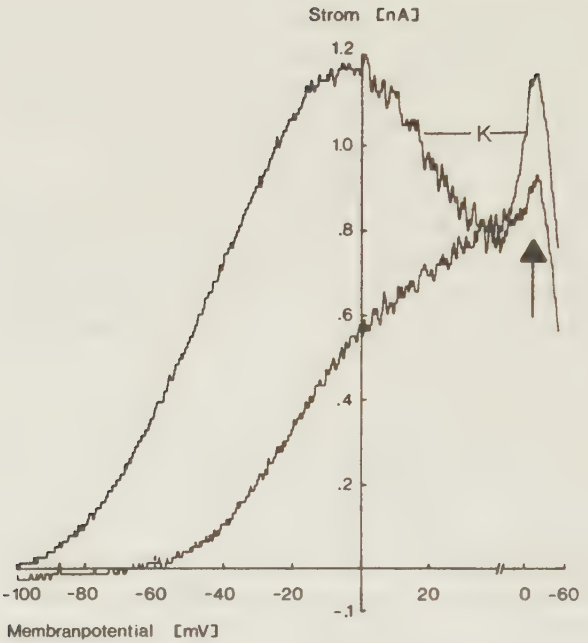


Abb. 13: Stromspannungskurven (aufgenommen wie in Abb. 10) nach Induzierung des K-Stroms und in Gegenwart von 0,2 mM $BaCl_2$. Die obere Kurve (K) zeigt die Stromspannungsbeziehung einer Zelle nach voller Induzierung des K-Stroms (2 mM K_o). Zum Vergleich darunter die Stromspannungskurve nach Wechsel auf Ba-haltige Badlösung (Amplitude zweifach verstärkt). Auf der rechten Seite wird erkennbar, daß bei Umkehrung der Rampenspannung und einer gleichzeitig höheren Spannungsänderung (10 mV/s; die Abszisse ist hier in umgekehrter Richtung und im anderen Maßstab beschriftet) die durch Ba^{++} beeinflußte Stromspannungsbeziehung wegen der Zeit- und Spannungsabhängigkeit der Blockierung über das bei +40 mV erreichte Maximum zunächst weiter ansteigt (s. Pfeil).

verstopften. In zwei erfolgreichen Experimenten konnte jedoch eine Induzierung des K-Stroms beobachtet werden, die zwar mit deutlicher Verzögerung einsetzte, sich aber ansonsten nicht von den Versuchen mit höheren Ca-Konzentrationen unterschied. Ca-Ionen kommt daher möglicherweise nur eine indirekte Beteiligung zu, indem sie den Vorgang der Induzierung des K-Stroms beschleunigen, aber nicht ursächlich hervorrufen. Eine weitere Untersuchung der an der Induzierung beteiligten Komponenten wurde nicht durchgeführt.

4. K-Kanäle in der CAP-Ableitung

An Herzpräparationen sind mit Hilfe der Spannungsklemme bisher eine Anzahl verschiedener K-Ströme beschrieben worden (vgl. Einleitung). Die Identifizierung dieser Ströme auf der Ebene einzelner Ionenkanäle steht jedoch zur Zeit noch aus. Erste Einzelkanaluntersuchungen sind an einwärtsgleichrichtenden K-Kanälen isolierter Ventrikelzellen (Trube et al., 1981; Trube & Hescheler, 1983) und an einem ACh-sensitiven K-Kanal in isolierten AV- und Sinusknotenzellen (Sakmann et al., 1983) gelungen. Eine detaillierte Beschreibung und ein Vergleich dieser Kanäle mit den aus herkömmlichen Spannungsklemmversuchen bekannten Stromsystemen ist noch nicht erfolgt.

Ziel erster Patch-clamp-Untersuchungen sollte eine Bestandsaufnahme verschiedener K-Kanäle in der Membran von Cardioballs sein. Dabei sollte der Schwerpunkt auf einer Korrelation der Eigenschaften von K-Kanälen mit dem an der gesamten Zelle beobachteten Verhalten der K-Ströme liegen. Die Pipettenlösung wurde daher so gewählt, daß bei der WCR- und OSOP-Ableitung, bezogen auf die K-Kanäle, angenähert physiologische Ionengradienten über der Membran lagen. Da beide Ableitkonfigurationen stets über eine CAP-Ableitung erreicht werden, bestand gleichzeitig die Möglichkeit, das Verhalten einzelner K-Kanäle auch unter den Bedingungen der CAP-Ableitung zu untersuchen. Bei der letztgenannten Ableitkonfiguration steht die Pipettenlösung (140 mM KCl, 10 mM HEPES-NaOH pH 7,2) mit der Außenseite der geklemmten Zellmembran in Kontakt, während das Ionenmilieu im Zellinneren unverändert bleibt, d.h., die K-Ionenverteilung über dem geklemmten Membranbereich ist annähernd symmetrisch.

Die erfolgreiche Ausbildung des hohen Abdichtwiderstands ließ in den meisten Fällen einzelne, rechteckige Stromfluktuationen sichtbar werden, da das Hintergrundstromrauschen stark reduziert wurde. In über 90% der Versuche (von ca. 120 erfolgreichen Ableitungen) konnten in der CAP-Ableitung charakteristische Stromsprünge, die offensichtlich Einzelkanalereignisse widerspiegelten, nachgewiesen werden. Bei konstanter Membranspannung konnten zwei Typen von Einzelkanalereignissen, wie sie

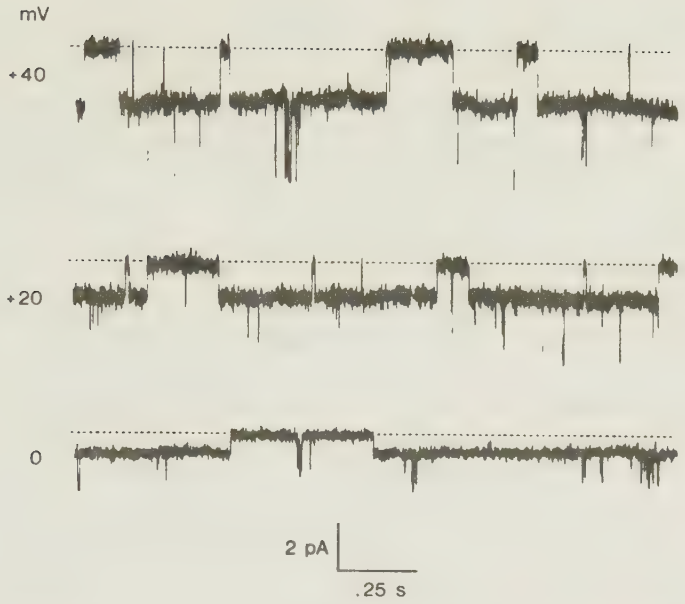


Abb. 14: Originalregistrierungen von zwei verschiedenen einwärtsgerichteten K-Kanälen in einer CAP-Ableitung (Filter 1 kHz, Tiefpaß, -3 dB). Bei den angegebenen Pipettenspannungen ist der untersuchte Membranpatch (Ruhepotential der Zelle ca. -40 mV) auf Spannungen negativer als E_K geklemmt. Die gestrichelten Geraden kennzeichnen den Zustand, wenn beide Kanäle geschlossen sind. Sromsprünge nach unten kennzeichnen eine Leitfähigkeitserhöhung der Membran für einwärtsgerichtete K-Ströme.

in Abb. 14 anhand einer Originalregistrierung dargestellt sind, reproduzierbar nachgewiesen werden. Beide Kanäle konnten aufgrund der Stromrichtung und der Lage des extrapolierten Umkehrpotentials als K-Kanäle identifiziert werden. Die Einzelkanalströme beider Kanäle konnten nur in Einwärtsrichtung bei Membranspannungen negativer als E_K beobachtet werden (dies entspricht Pipettenspannungen, die positiver als das jeweilige Ruhepotential sind; vgl. Methodik).

Die beiden Kanaltypen können vor allem anhand ihrer unterschiedlichen Offenzeiten unterschieden werden. Der Kanal mit den vergleichsweise langen Offenzeiten (τ_o im Bereich von mehreren hundert ms) ist äußerst selten anzutreffen (in weniger als 5% der Aufnahmen). Er besitzt im untersuchten Spannungsbereich eine hohe Offenwahrscheinlichkeit; manchmal werden über einen Zeitraum von mehreren Minuten nur wenige vereinzelte Geschlossenereignisse beobachtet. Die Einzelkanalleitfähigkeit, berechnet aus dem linearen Verlauf der Einzelkanalstromspannungsbeziehung, liegt bei ca. 40 pS. Dieser Kanal ist von der Einzelkanalleitfähigkeit und vom Erscheinungsbild her mit dem einwärtsgleichrichtenden K-Kanal anderer Herzzellen vergleichbar (Trube et al., 1981; Sakmann et al., 1983). Eine weitergehende Analyse dieses Kanals wurde dadurch verhindert, daß die Wahrscheinlichkeit, einen aktiven Kanal anzutreffen, zu gering war.

Demgegenüber besitzt der kurzlebige Kanal eine sehr hohe Beobachtungshäufigkeit; dieser Kanal konnte in nahezu allen Ableitungen beobachtet werden. Der Einzelkanalstrom besitzt im untersuchten Spannungsbereich eine lineare Abhängigkeit vom Membranpotential, wie in Abb. 15 gezeigt wird. Bei Pipettenspannungen von -20 mV bis +60 mV steigt der Einzelkanalstrom im dargestellten Experiment von 2,5 pA auf 6,3 pA an. Bei Extrapolation der eingezeichneten Regressionsgeraden auf die Abszisse ergibt sich ein Umkehrpotential von -74 mV. Berücksichtigt man das anschließend bestimmte Ruhepotential der Zelle von ca. -72 mV, so stimmt das Umkehrpotential des Einzelkanalstroms mit dem für die gegebenen Bedingungen erwarteten K-Gleichgewichtspotential von 0 mV überein.

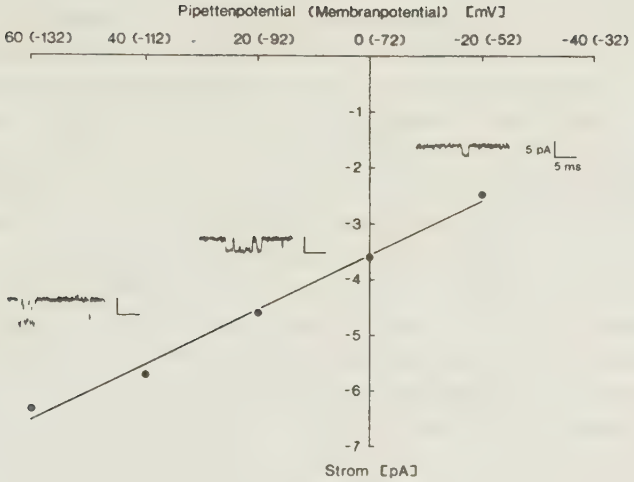


Abb. 15: Stromspannungsbziehung des Einzelkanalstroms. Der Einzelkanalstrom durch den kurzlebigen K-Kanal (vgl. Abb. 14) ist im untersuchten Spannungsbereich (CAP-Ableitung) einwärtsgerichtet. Auf der Abszisse ist neben der Pipettenspannung die bei einem Ruhepotential von -72 mV (im Anschluß an die Ableitung durch Zerstören des Membranpatches gemessen) erwartete Klemmspannung der Membran in Klammern angegeben. Die lineare Regression (erfolgte in allen Fällen nach der Methode des kleinsten Abstandsquadrats) der Meßpunkte ergab eine Einzelkanalleitfähigkeit von 49 pS und ein extrapoliertes Umkehrpotential von ca. -74 mV. Dieser Wert ist annähernd mit dem erwarteten K-Gleichgewichtspotential identisch.

Da sich bei der CAP-Ableitung die aktuelle Klemmspannung der Membran aus der Differenz von Membranruhe- und Pipettenpotential ergibt, ist eine exakte Bestimmung der Klemmspannung oft nicht möglich, insbesondere wenn das Ruhepotential nicht stabil ist. Änderungen im Ruhepotential der Zellen während der Ableitung resultieren in einer nichtlinearen Spannungsabhängigkeit des Einzelkanalstroms. Die Auswertung von Versuchen, in denen das Ruhepotential konstant geblieben war, ergab eine Einzelkanalleitfähigkeit von 49 $\pm$ 9,1 pS (N = 8). Das Umkehrpotential lag aufgrund der Variabilität im Ruhepotential der Cardioballs im Bereich von -20 bis -70 mV (Pipettenpotential). Wenn das Ruhepotential im Anschluß an die Messung direkt bestimmt werden konnte, so zeigte sich, daß das für einen K-Strom erwartete Umkehrpotential mit dem tatsächlich bestimmten Nullstrompotential der Membran gut übereinstimmte.

Eine direkte Umkehrung des Einzelkanalstroms bei Pipettenpotentialen negativer als das Ruhepotential der Zelle konnte nicht beobachtet werden. Obwohl zur Zeit noch keine ausreichende Erklärung für diesen Befund gegeben werden kann, ist die Ursache möglicherweise in einer drastischen Reduzierung der Offenwahrscheinlichkeit bei diesen Membranspannungen zu suchen, die eine Identifizierung der ohnehin schon sehr kurzen Offenereignisse verhindert.

Die relativ kurzen Offenzeiten des Kanals (τ_o <5 ms) im untersuchten Membranpotentialbereich ließen eine kinetische Analyse der Offenzeiten zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund begrenzter, zeitlicher Auflösung bei der Ableitung als wenig sinnvoll erscheinen. Erschwerend kommt hinzu, daß der Kanal unter Kontrollbedingungen nur eine sehr geringe Offenwahrscheinlichkeit ($P_o \approx 0{,}01$) besitzt. Eine solche niedrige Offenwahrscheinlichkeit verhindert eine Bestimmung der Anzahl aktiver Kanäle im untersuchten Membranbereich, da selbst beim Vorkommen mehrerer Kanäle nur sehr selten deren gleichzeitiges Öffnen registriert werden kann. Sowohl die Berechnung der Offenwahrscheinlichkeit als auch eine Auswertung der Geschlossenereignisse kann aber nur erfolgen, wenn die Zahl der aktiven Kanäle

bekannt ist. So wird beispielsweise die Offenwahrscheinlichkeit in einer Registrierung, die zwei aktive Kanäle enthält, aber keine Doppelereignisse aufweist, d.h. Offenereignisse, die durch die Überlagerung zweier Einzelereignisse der beiden Kanäle entstehen, um den Faktor zwei zu groß bestimmt.

Enthält die Pipettenlösung den parasympathischen Transmitter Acetylcholin (ACh, 10^{-7} - 10^{-5} M), so schien die Aktivität dieses Ionenkanals gegenüber der Kontrolle erhöht. Da die Aktivität der Kanäle in Gegenwart ACh-freier Lösung aber einer hohen Variabilität unterworfen war, konnte mit dem methodischen Ansatz, ACh der Pipettenlösung zuzusetzen, keine eindeutige Identifizierung der durch ACh induzierten Kanalaktivität erbracht werden. Ein direkter Nachweis einer durch ACh induzierten Kanalaktivität ist mit Sicherheit nur über eine Änderung der ACh-Konzentration in der Pipettenlösung während der Ableitung möglich. Um dies zu realisieren, wurde der üblicherweise verwendete Pipettenhalter nach Hamill et al. (1981) in der in der Methodik angegebenen Weise modifiziert.

Das Ergebnis eines mit dieser Anordnung durchgeführten Versuchs ist in Abb. 16 dargestellt. Zunächst wurde die Kanalaktivität unter Kontrollbedingungen registriert (B). Nach Freisetzen einer ACh-haltigen Lösung (10^{-5} M) mit einer ansonsten identischen Zusammensetzung wie die Kontrollösung kommt es innerhalb weniger Sekunden zu einer deutlichen Erhöhung der Kanalaktivität (Abb. 16 A: Übersicht, Ausschnitte C und D während der Aktivitätszunahme). Die durch ACh induzierten Stromfluktuationen lassen sich von den unter Kontrollbedingungen auftretenden Einzelkanalereignissen weder in der Amplitude (vgl. Abb. 17) noch durch erkennbar geänderte Offenzeiten unterscheiden.

In Abb. 17 wird anhand der Amplitudenhistogramme aus dem dargestellten Versuch noch einmal belegt, daß es in Gegenwart von ACh weder zu einer Änderung der Einzelkanalamplitude noch zur Induzierung eines Kanals mit geänderter Amplitude kommt. Vielmehr erfolgt eine Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit der bereits vorhandenen Kanäle. Dies wird in den gezeigten Histogrammen besonders deutlich, wenn man die Wahrscheinlichkeitsab-

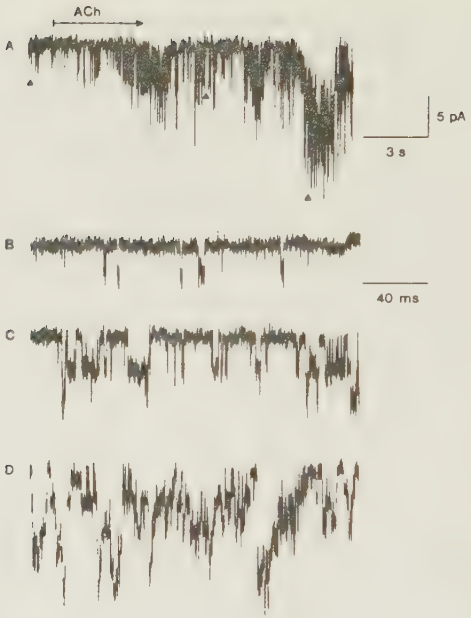


Abb. 16: Aktivierung von K-Kanälen durch Injektion von ACh in die Patchpipette. Die Übersicht (A) zeigt, daß es nach Freisetzung von ACh zu einer drastischen Zunahme der Kanalaktivität in der CAP-Ableitung kommt (Pipettenspannung +40 mV). Die Registrierungen B bis D zeigen Ausschnittvergrößerungen vor (B) und während der Aktivitätszunahme (C und D; die entsprechenden Abschnitte sind in der Übersicht durch Pfeile gekennzeichnet). In D können einzelne Kanalereignisse wegen der Überlagerung mehrerer Kanäle nicht mehr eindeutig aufgelöst werden (Tiefpaßfilter 3 kHz).

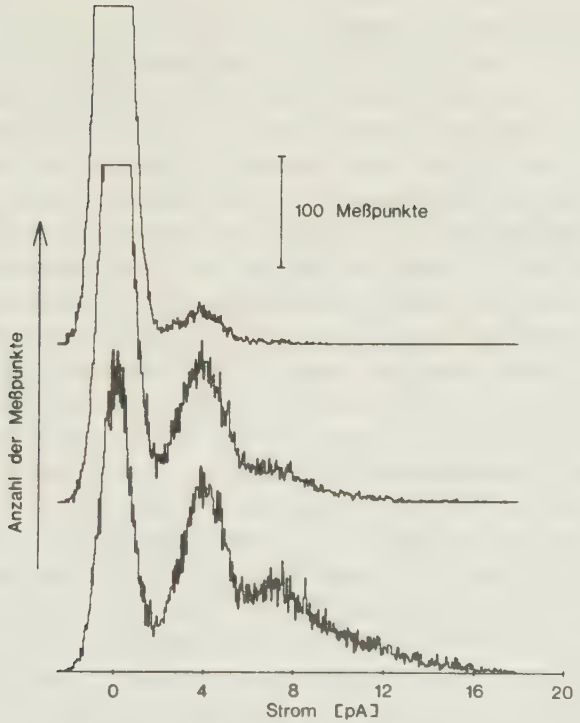


Abb. 17: Veränderungen des Amplitudenhistogramms unter dem Einfluß von ACh (dasselbe Experiment wie in Abb. 16). Die Histogramme wurden von jeweils 3 x 10^4 Meßpunkten (Digitalisierungsfrequenz 8 kHz) zu den in Abb. 16 mit Pfeilen markierten Zeiten erstellt. Die Spitzen der Verteilungen des geschlossenen Zustands aller Kanäle (Grundlinie) wurden in den beiden oberen Histogrammen zum besseren Vergleich abgeschnitten. Der zeitliche Anteil, in welchem alle Kanäle geschlossen sind, nimmt von 0,94 unter Kontrollbedingungen (oberes Histogramm) auf 0,37 (unteres Histogramm) ab. Die Verteilungsmaxima des ACh-induzierten Kanals besitzen dieselbe Einzelkanalamplitude wie die des Ruhe-K-Kanals.

nahme der Amplitude betrachtet, bei der alle Kanäle geschlossen sind; sie wird in Gegenwart von ACh von P = 0,9396 unter Kontrollbedingungen auf P = 0,3653 reduziert.

In einem anderen Versuch konnte nach der Freisetzung von ACh auch die blockierende Wirkung von Atropin belegt werden. Die Aktivität der Kanäle konnte durch die Freisetzung einer Atropin-haltigen Lösung (10^{-5} M) wieder bis auf die unter Kontrollbedingungen gemessene Aktivität reduziert werden. In weiteren Kontrollexperimenten konnte ausgeschlossen werden, daß die gewöhnlich unter Kontrollbedingungen beobachtete Aktivität der Kanäle durch eventuelle Verunreinigungen der Pipettenlösungen mit ACh ausgelöst wurden. Auch bei der Verwendung von Pipettenlösungen, die Atropin in einer Konzentration von 10^{-5} M enthielten, konnte dieser Kanaltyp beobachtet werden.

Die Frage nach der Identität der unter ACh und unter Kontrollbedingungen sichtbaren K-Kanäle kann aus den bisherigen, experimentellen Daten noch nicht endgültig entschieden werden. Vergleichbare Öffnungszeiten, Leitfähigkeiten und Selektivitäten lassen jedoch die Vermutung zu, daß es sich um denselben Kanal handelt, dessen Offenwahrscheinlichkeit in Gegenwart von ACh zunimmt. Legt man diese Annahme zugrunde, so läßt sich im dargestellten Experiment (Abb. 16) eine Zunahme des P_o-Wertes von 0,01 im Kontrollzustand auf ca. 0,15 in Gegenwart von ACh näherungsweise abschätzen (unter der Annahme von 6 aktiven Kanälen).

5. Charakterisierung eines K-Kanals in der OSOP-Ableitung

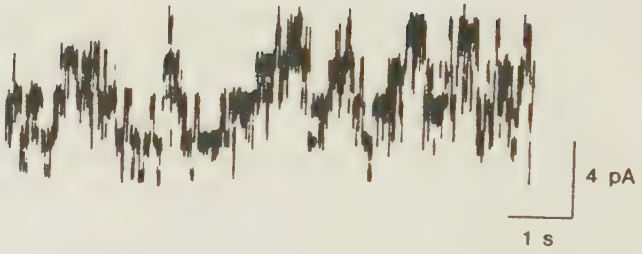
a. Selektivität und Leitfähigkeit

Unter CAP-Bedingungen bleibt das intrazelluläre Milieu unverändert, so daß sich der untersuchte Membranbereich zumindest in dieser Hinsicht in einem physiologischen Zustand befindet. Die Zusammensetzung der Außenlösung ist durch die Pipettenlösung vorgegeben. Eine Veränderung der Zusammensetzung dieser Lösung während des Experiments ist zwar prinzipiell möglich (vgl. Abb. 16), technisch zur Zeit aber noch sehr aufwendig. Das aktuelle Klemmpotential des untersuchten Membranbereichs kann unter dieser Ableitbedingung häufig nur geschätzt werden oder ist - bei spontanaktiven Zellen - überhaupt nicht zu kontrollieren.

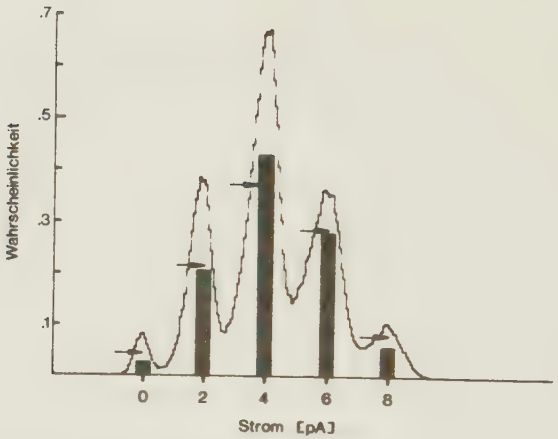
Im Gegensatz hierzu können bei der OSOP-Ableitung sowohl die Zusammensetzungen der Lösungen auf beiden Membranseiten als auch die Klemmspannung genau kontrolliert werden. Der Austausch der intrazellulären Lösung bedingt aber, daß intrazelluläre Regelmechanismen, die für den Aktivitätszustand verschiedener Kanäle vermutlich eine Rolle spielen (vgl. z.B. Ca-Kanäle: Reuter, 1983), gestört bzw. ganz ausgeschlossen werden. In diesem Punkt gibt es zwischen der OSOP- und WCR-Ableitung, wenn die intrazelluläre Lösung komplett gegen die Pipettenlösung ausgetauscht ist, keinen Unterschied. Unter beiden Ableitbedingungen sollten von daher dieselben Ströme sichtbar werden.

In der OSOP-Ableitung wird reproduzierbar ein Typ von Stromfluktuationen gefunden. Diese Stromfluktuationen sind in Abb. 18 A am Beispiel einer Originalregistrierung (Membranpotential 0 mV) dargestellt. Im Verlauf der folgenden Minuten einer Ableitung nimmt die Anzahl sichtbarer Stufen kontinuierlich ab, bis keine weiteren Stromsprünge mehr erkennbar sind. Die Abnahme der Stromfluktuationen, die nicht mit einer Änderung der Ableitungsbedingungen verbunden ist, dauert bis zum völligen Verschwinden zwischen 10 bis 40 Minuten.

Unter der Annahme, daß die verschiedenen Stromstufen durch das Öffnen und Schließen unabhängiger Kanäle gleicher Amplitude entstehen, müssen sich die Wahrscheinlichkeiten der einzelnen



A



B

Abb. 18: Originalregistrierung (Tiefpaßfilter 1 kHz) von Einzelkanalfluktuationen in einer OSOP-Ableitung (Membranpotential 0 mV, 2 mM K_o) und das dazugehörige Amplitudenhistogramm (Analysezeit 10 s, Digitalisierungsfrequenz 50 kHz). Die 5 ausgeprägten Maxima des Amplitudenhistogramms lassen auf das unabhängige Öffnen und Schließen von 4 Kanälen schließen. Die aus den Integralen der Verteilungen der verschiedenen Niveaus ermittelten Aufenthaltswahrscheinlichkeiten sind in Form von Säulen in die Abb. eingetragen (Ordinate dazu am linken Rand). Die Pfeile kennzeichnen die bei einer mittleren Offenwahrscheinlichkeit von $\overline{P}_o$ = 0,54 nach einer Binominalverteilung erwarteten Aufenthaltswahrscheinlichkeiten.

Stromstufen entsprechend einer Binominalverteilung verhalten. In dem in Abb. 18 dargestellten Experiment wird untersucht, inwieweit diese Annahme zutrifft und die gemessenen Wahrscheinlichkeiten mit der theoretischen Verteilung übereinstimmen.

Dazu wurde zunächst von der Originalregistrierung (gleiche Aufnahme wie in A) ein Amplitudenhistogramm erstellt (kontinuierlicher Kurvenzug in Abb. 18 B; Digitalisierungsfrequenz f = 50 kHz; Analysezeit T = 10 s). Das Amplitudenhistogramm hebt noch einmal hervor, daß bestimmte Amplituden - die den einzelnen Stromstufen entsprechen - eine hohe Aufenthaltswahrscheinlichkeit besitzen. Die Maxima des Histogramms geben von links nach rechts betrachtet an, welche Stromamplituden erreicht werden, wenn alle Kanäle geschlossen bzw. einer, zwei, drei oder vier Kanäle offen sind. Die Wahrscheinlichkeit, daß eine der genannten Kombinationen vorkommt, läßt sich berechnen, indem die Kurvenabschnitte zwischen benachbarten Minima integriert und durch die gesamte Analysezeit dividiert werden. Die Integrale der Kurvenabschnitte zwischen benachbarten Minima geben dabei die Summen der Aufenthaltszeiten für die betreffenden Stufen an. Die Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten der einzelnen Stromstufen sind in Abb. 18 B in Form von Säulen eingetragen.

Die mittlere Offenwahrscheinlichkeit der registrierten Kanäle läßt sich nun wie folgt ermitteln:

$$\bar{P}_o = (P_{A1} + 2\,P_{A2} + ... + n\,P_{An})/n \qquad (8)$$

wobei n die Anzahl der Stufen entsprechend der Anzahl aktivierter Kanäle und P_{A1} bis P_{An} die jeweiligen Wahrscheinlichkeiten der verschiedenen Stromstufen darstellen. Die Amplitude, bei der alle Kanäle geschlossen sind, wird als Stufe Null gerechnet. Mit der mittleren Offenwahrscheinlichkeit (in Abb. 18 B $\bar{P}_o$ = 0,54) und der Anzahl aktiver Kanäle (n = 4) können nun die nach einer Binominalverteilung erwarteten Wahrscheinlichkeiten der einzelnen Stromstufen berechnet werden. In Abb. 18 B sind diese erwarteten Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der einzelnen Stromstufen durch Pfeile angedeutet. Die gemessenen Werte

lassen sich hinreichend gut durch die theoretische Verteilung beschreiben; die Annahme, daß es sich um mehrere Kanäle eines Typs handelt, die unabhängig voneinander öffnen und schließen, gilt daher als wahrscheinlich.

Normalerweise wurden die Ableitungen lediglich dann ausgewertet, wenn sie nur einen oder sehr wenige Kanäle enthielten, deren Aktivität zumindest über einen Zeitraum von einigen Minuten konstant blieb. Dies war nur bei ca. 10% der erfolgreich hergestellten OSOP-Ableitungen möglich.

In Abb. 19 sind Einzelkanalregistrierungen bei verschiedenen Membranspannungen dargestellt. Der offene Zustand unterscheidet sich vom geschlossenen (markiert durch die gestrichelte Linie) deutlich durch höheres Stromrauschen und durch kurzzeitige Unterbrechungen, die Flicker (vgl. Methodik). Bei Spannungen positiver als E_K fließt der Einzelkanalstrom in Auswärtsrichtung, bei negativeren Spannungen kehrt sich die Stromrichtung um, die Kanalereignisse sind nun einwärts gerichtet. Diese Umkehrung des Einzelkanalstroms konnte allerdings nur bei hohen K_o (in Abb. 19 K_o = 20 mM; E_K= 50 mV) beobachtet werden. Niedrige Konzentrationen erfordern zur Beobachtung einer Stromumkehrung wegen der Verschiebung des E_K zu negativeren Spannungen Klemmpotentiale von mehr als -100 mV. Solche hohen Pipettenspannungen führen aber regelmäßig zu einer starken Zunahme des Hintergrundrauschens, unspezifischen Membrandurchbrüchen und häufig zur Zerstörung der Membran.

Die Stromrichtung der Kanäle und ihre Umkehr in der Nähe des K-Gleichgewichtspotentials legen bereits die Vermutung nahe, daß es sich bei dem untersuchten Kanal um einen K-selektiven Kanal handelt. In Abb. 20 wird diese Annahme durch die Spannungsabhängigkeit des Einzelkanalstroms weiter erhärtet. Trägt man den Einzelkanalstrom, der jeweils aus den Abständen der Maxima im Amplitudenhistogramm bestimmt wurde, gegen die Spannung auf, so erhält man über einen weiten Spannungsbereich einen linearen Zusammenhang. Die Steigung der resultierenden Regressionsgeraden kennzeichnet die Einzelkanalleitfähigkeit und der Schnittpunkt mit der Abszisse das Umkehrpotential. Bei

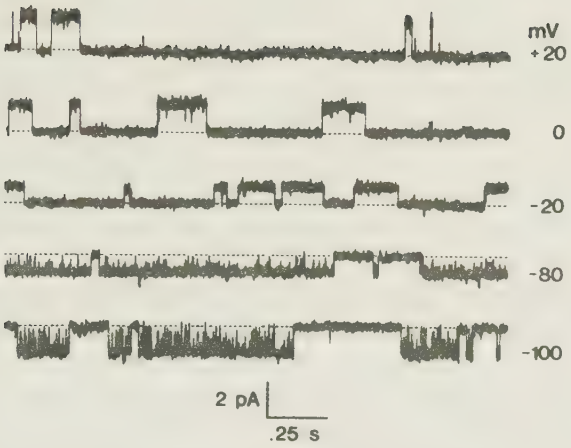


Abb. 19: Registrierung eines einzelnen aktiven Kanals in der OSOP-Ableitung bei verschiedenen Membranspannungen (20 mM K_o, E_K = -50 mV, Tiefpaßfilter 1 kHz). Der geschlossene Zustand des Kanals wird durch eine gestrichelte Gerade gekennzeichnet. In Einwärtsrichtung werden die Offenereignisse durch zahlreiche Flicker unterbrochen.

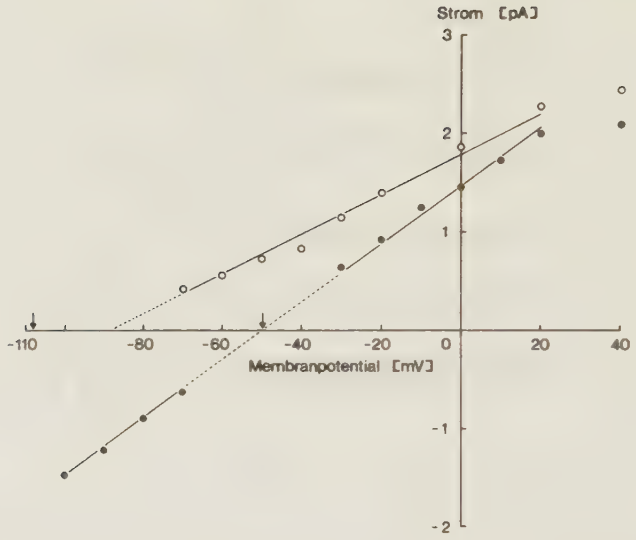


Abb. 20: Stromspannungsbeziehungen des Einzelkanalstroms aus zwei verschiedenen OSOP-Ableitungen bei 2 (o) und 20 (●) mM K_o. Die Punkte konnten durch Regressionsgeraden mit einer Steigung von 20 (o) bzw. 29 (●) pS und einem Umkehrpotential von -88 bzw. -50 mV angepaßt werden. Die berechneten E_K-Werte sind durch Pfeile angedeutet.

einer Veränderung der extrazellulären K-Konzentration kommt es nicht nur zu einer Verschiebung des Umkehrpotentials, sondern auch zur Änderung der Einzelkanalleitfähigkeit, was eine charakteristische Eigenschaft von K-Kanälen zu sein scheint (vgl. z.B. Hille & Schwarz, 1978). Während das Umkehrpotential (E_{rev}) von ca. -90 mV bei 2 mM K_o auf -48 mV bei 20 mM abnimmt, steigt die Leitfähigkeit von 20 auf 29 pS an. In Tabelle 3 sind die Mittelwerte aus allen Versuchen zusammengefaßt.

In einigen Experimenten zeigte der Einzelkanalstrom bei Spannungen positiver als +20 mV eine Sättigung. Dies bedeutet, daß der Einzelkanal unter den gegebenen Bedingungen eine maximale Transportrate erreicht, die auch bei höherer treibender Spannung nicht überschritten werden kann.

Unter der Annahme, daß der untersuchte Kanal im wesentlichen nur für Na- und K-Ionen permeabel ist, läßt sich mit Hilfe der Goldmanngleichung (s. S. 2, Gleichung (1)) das Permeabilitätsverhältnis $a = P_{Na}/P_K$ als Maß für die Selektivität des Kanals berechnen. Mit den Mittelwerten für E_{rev} bei verschiedenen K_o, wie sie in der Tab. 3 aufgelistet sind, lassen sich Permeabilitätsverhältnisse berechnen, die deutlich niedriger als bei anderen K-Kanälen, insbesondere dem Ca-aktivierten K-Kanal sind (zum Vergleich: Methfessel & Boheim, 1982: a = 0,06-0,05; Latorre & Miller, 1983). Der beobachtete Kanal läßt sich damit zweifelsfrei als K-Kanal identifizieren.

Die hohe Selektivität für K-Ionen und die geringere Leitfähigkeit lassen es als unwahrscheinlich erscheinen, daß der hier beschriebene Kanal mit dem an verschiedenen Zellen nachgewiesenen Ca-aktivierten K-Kanal identisch ist (Colquhoun et al., 1981; Lux et al., 1981; Marty, 1981; Barrett et al., 1982; Methfessel & Boheim, 1982). Auch Versuche zur Ca-Abhängigkeit der Kanalaktivierung belegen die Verschiedenheit beider Kanaltypen. So konnte in einem Konzentrationsbereich von ca. 10^{-9} bis 10^{-4} M Ca_i eingestellt durch eine Ca-EGTA-Pufferung der Pipettenlösung, kein Einfluß auf die Aktivität der Kanäle nachgewiesen werden (vgl. hierzu auch den Abschnitt "Stromspannungsbeziehungen der Cardioballs"). Auch Pipettenlösungen mit 140 mM K-Citrat anstelle von KCl (freie Ca-Konzentration $\leq 10^{-8}$ M

aufgrund der Ca-Citratkomplexbildung) veränderten die Amplitude und Aktivität der Stromfluktuationen nicht. Ferner bestätigen die Versuche mit geänderten Anionenkonzentrationen in der Pipettenlösung - neben Chlorid und Citrat wurde auch Aspartat getestet -, daß Anionen als Ladungsträger an den beobachteten Einzelkanalströmen nicht beteiligt sind. Es handelt sich daher eindeutig um einen K-spezifischen Kationenkanal.

Tabelle 3: Einzelkanalleitfähigkeit und -selektivität

K_o/mM	2	5	20
Anzahl der Versuche	11	6	5
Einzelkanalleitfähigkeit/pS	19,7 ± 3,2	24 ± 4,2	32,6 ± 3,5
extrapoliertes Umkehrpotential E_{rev}/mV	-90 ± 8,2	-78 ± 10	-49 ±3,5
K-Gleichgewichtspotential/mV	-109	-85	-50
P_{Na}/P_K	0,016	0,011	0,0056

b. Kinetische Eigenschaften des Kanals

Der in einem bestimmten Zeitabschnitt durch einen Ionenkanal fließende Strom wird zum einen durch die Einzelkanalleitfähigkeit und zum anderen durch die Dauer und Häufigkeit des offenen Zustands bestimmt. Während, wie oben gezeigt wurde, die Leitfähigkeit des Kanals bei gegebenem K_o in weiten Bereichen spannungsunabhängig ist, ergibt sich ein deutlicher Einfluß der Membranspannung auf die kinetischen Eigenschaften.

Eine genaue Analyse der Offen- und Geschlossenzeiten ist nur bei Ableitungen möglich, die einen einzigen, aktiven Ionenkanal über hinreichend lange Zeit enthalten. Dies war jedoch nur bei sehr wenigen Ableitungen der Fall. So enthielten über 90% der Registrierungen zu Beginn mehr als einen Kanal und zeigten zudem oftmals eine zeitliche Veränderung der Kanalaktivität, so daß keine sinnvolle Auswertung möglich war.

Registrierungen mit nur einem aktiven Kanal wurden nach der in der Methodik angegebenen Weise ausgewertet. Abb. 21 zeigt die Verteilungen der Offenereignisse bei verschiedenen Membranspannungen in halblogarithmischer Auftragung. Entsprechend dem in der Methodik beschriebenen, einfachen Reaktionsmodell mit nur einem offenen und einem geschlossenen Zustand, lassen sich die Meßwerte durch einen einfachen exponentiellen Kurvenverlauf anpassen. Die aus der halblogarithmischen Auftragung ermittelten Zeitkonstanten (τ_o) sind von der angelegten Membranspannung abhängig.

Die Mittelwerte der Zeitkonstanten aus vier Versuchen sind in Abb. 22 A halblogarithmisch gegen die Membranspannung aufgetragen. Die Offenzeitkonstanten besitzen eine einfache exponentielle Spannungsabhängigkeit; für eine e-fache Änderung der mittleren Lebensdauer des offenen Zustands ist eine Membranpotentialänderung um 26 mV notwendig. Es muß daher angenommen werden, daß beim Übergang vom offenen in den geschlossenen Zustand eine Ladungsverschiebung im elektrischen Feld der Membran stattfindet.

Bei der Auswertung der Geschlossenereignisse ergab sich, daß die Geschlossenzeitkonstanten im Vergleich zu den Offenzeitkonstanten eine umgekehrte Spannungsabhängigkeit mit etwa gleich

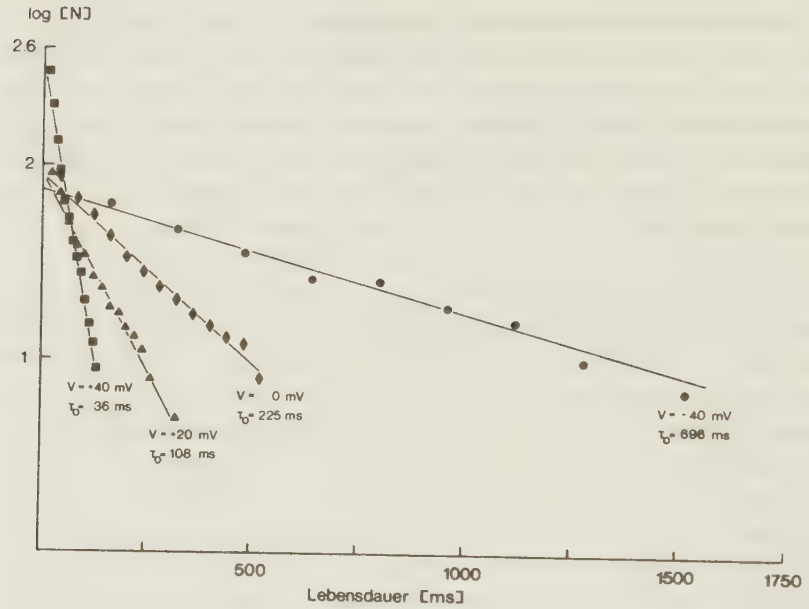


Abb. 21: Verteilungen der Offenzeiten bei verschiedenen Membranspannungen. Die Anzahl der Offenereignisse (N (t)), die länger als eine bestimmte Lebensdauer (t) anhalten, sind halblogarithmisch gegen die Lebensdauer aufgetragen. Aus der linearen Regression der Meßpunkte ergeben sich die angegebenen Offenzeitkonstanten.

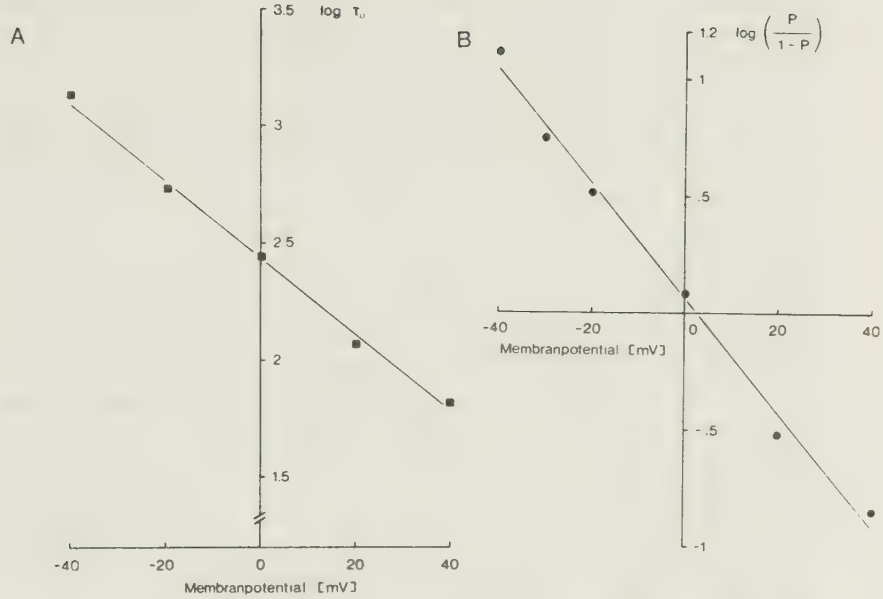


Abb. 22: A. Halblogarithmische Auftragung der Offenzeitkonstanten gegen die Membranspannung.
B. Halblogarithmische Auftragung des Quotienten $P_o/(1-P_o)$ gegen die Membranspannung.
Die einzelnen Punkte stellen die Mittelwerte aus jeweils vier verschiedenen Versuchen dar; die eingezeichneten Geraden wurden durch lineare Regression ermittelt (weitere Erläuterungen im Text).

ordem Exponenten besitzen. Die Auswertung führte jedoch im allgemeinen zu weniger einheitlichen Ergebnissen. So konnte in einigen Fällen die Verteilung mit einer Zeitkonstanten nicht befriedigend beschrieben werden; andererseits war auch eine deutliche Unterscheidung verschiedener Zeitkonstanten nicht mit Sicherheit möglich. Die Verteilungen enthielten oftmals Ereignisse, die entweder zu kurz oder zu lang erschienen. Offensichtlich besitzt der Kanal im Unterschied zu einem einfachen Reaktionsmodell mehrere geschlossene Zustände mit identischer Amplitude. Geschlossenereignisse, die vom Übergang in diese Zustände herrühren, wie beispielsweise Flicker oder langandauernde Geschlossenzeiten, die den Vorgang einer Inaktivierung repräsentieren, führen zu Abweichungen von einer einfachen exponentiellen Verteilung der Geschlossenzeiten (vgl. Analyse des Ba-Blocks). Werden diese Ereignisse durch die Vorgabe einer minimalen und maximalen Lebensdauer von der Analyse ausgeschlossen, so ist in erster Näherung die Annahme des einfachen Reaktionsmodells mit je einem offenen und geschlossenen Zustand zulässig (vgl. Methfessel & Boheim, 1982).

Für das auf Seite 37 beschriebene Reaktionsmodell (4) mit zwei Zuständen läßt sich die Gleichgewichtskonstante K wie folgt beschreiben:

$$K = \frac{k_g}{k_o} = \frac{\tau_o}{\tau_g} = P_o/(1-P_o) \qquad (9)$$

Die Gleichgewichtskonstante gibt das unter stabilen Systembedingungen sich einstellende zeitliche Verhältnis von offenem zu geschlossenem Zustand oder - bezogen auf eine Vielzahl unabhängiger Kanäle - das Verhältnis von offenen zu geschlossenen Kanälen an. Wie aus der Spannungsabhängigkeit von τ_o und τ_g ersichtlich, ist dieses Verhältnis auch von der Membranspannung abhängig. Dabei wird angenommen, daß bei der Zustandsänderung des Kanals Ladungen im elektrischen Feld der Membran bewegt werden. Je nach der Richtung des elektrischen Feldes wird jeweils der eine Übergang energetisch bevorzugt und der andere erschwert. Die Veränderung des Potentialgradienten über der Mem-

bran verschiebt so das Gleichgewicht der Reaktion.

Die Verteilung von Teilchen (hier postulierte geladene Gruppen des Kanals) in einem äußeren Kraftfeld (hier dem elektrischen Feld) wird im allgemeinen durch die Boltzmann-Verteilung beschrieben (vgl. Gerthsen et al., 1974; Adam et al., 1977). Betrachtet man nur die Abhängigkeit der Verteilung von der Membranspannung V, so ergibt sich für K (V) folgende Beziehung (vgl. Methfessel & Boheim, 1982):

$$K(V) = \exp\left[n \cdot z \cdot F \cdot (V - V^{+}) / R \cdot T\right] \qquad (10)$$

n ist der Anteil der Gesamtspannung, der an einer z-fach geladenen Gruppe beim Öffnen bzw, Schließen des Kanals wirksam ist; V^{+} charakterisiert die Spannung bei der K = 1 ist; R, T, F haben ihre übliche thermodynamische Bedeutung. Unter der Annahme eines linearen Spannungsgradienten über der gesamten Membrandicke, gibt n den Anteil des Membrandurchmessers an, über den die geladenen Gruppen verschoben werden, die sogenannte elektrische Distanz.

In Abb. 22 B ist die Gleichgewichtskonstante als Quotient $P_o/(1-P_o)$ in halblogarithmischer Darstellung gegen die Membranspannung aufgetragen. Die Meßpunkte lassen sich durch eine Regressionsgerade annähern, deren Steigung Aufschluß über die Energie ergibt, die für die Konformationsänderung des Kanals benötigt wird. Bezogen auf F/RT besitzt die Gerade eine Steigung von 1,5. Dieser Befund läßt sich beispielsweise so interpretieren, daß 2 Elementarladungen beim Öffnen bzw. Schließen des Kanals über 75% des elektrischen Feldes der Membran verschoben werden oder eine größere Anzahl von Ladungen über eine entsprechend kleinere Distanz.

c. Rekonstruierte steady-state Stromspannungsbeziehung

Die auf der Grundlage der Einzelkanalparameter für die gesamte Zelle erwartete - makroskopische - steady-state Stromspannungsbeziehung dieses Stromsystems läßt sich durch folgende Beziehung rekonstruieren:

$$I(V) = N \cdot I_{unit}(V) \cdot P_o(V) \qquad (11)$$

N ist die Anzahl der Kanäle im geklemmten Membranbereich. I_{unit}, der Einzelkanalstrom, und P_o, die Offenwahrscheinlichkeit, sind dabei von der Membranspannung (V) abhängig. Setzt man N = 1, so erhält man die in Abb. 23 gezeigte Stromspannungsbeziehung. Die Kurve hat bei ca. -15 mV ein Maximum und im Bereich positiver Spannungen eine negative Steigung. Die P_o-Werte für Spannungen negativer -40 mV konnten nicht bestimmt werden, da infolge der geringen treibenden Spannung die Einzelkanalereignisse nicht ausreichend deutlich erkennbar waren. Die Beziehung wurde in diesem Bereich in Richtung auf das erwartete Umkehrpotential des Einzelkanalstroms extrapoliert, indem $P_o = 1$ gesetzt wurde. Diese Annäherung repräsentiert den in diesem Potentialbereich maximal möglichen Strom.

Der durch den untersuchten Kanal repräsentierte Strom zeigt nach dem Verlauf der Stromspannungskurve eine ausgeprägte Einwärtsgleichrichtung. Dieser Typ der anomalen Gleichrichtung ist eine seit langem bekannte Eigenschaft verschiedener K-Ströme in erregbaren Membranen (vgl. z.B. Junge, 1976; s.a. Einleitung).

Die rekonstruierte Stromspannungsbeziehung zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die an der gesamten Zelle nach Dialyse des Zellinneren mit der Pipettenlösung ermittelte Stromspannungsbeziehung (Abb. 12 A, Kurve C; Abb. 13, Kurve K). Da bei beiden Ableitkonfigurationen (WCR und OSOP) in bezug auf die Zusammensetzung der Lösungen auf beiden Membranseiten annähernd identische Bedingungen vorliegen, ist anzunehmen, daß der zusätzlich induzierte K-Strom durch den im Vorhergehenden beschriebenen K-Kanal fließt.

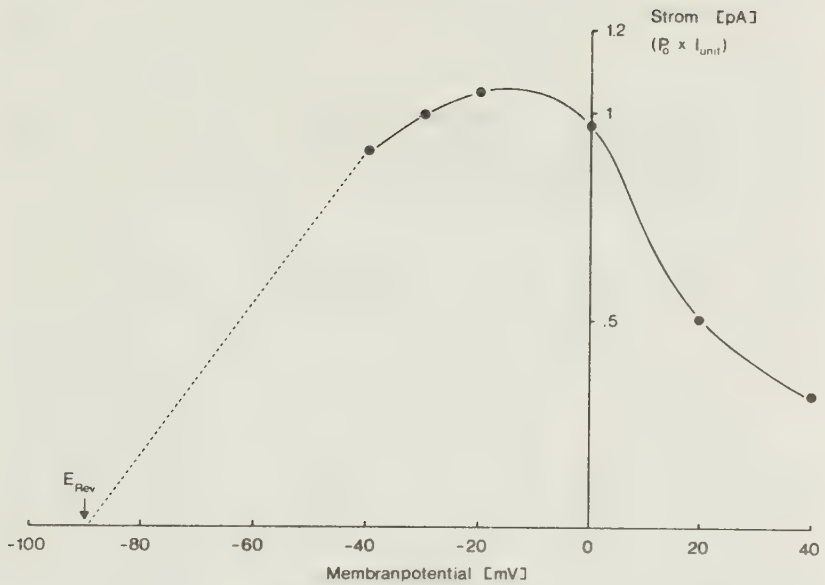


Abb. 23: Aus den Einzelkanalparametern rekonstruierte, "makroskopische" steady-state Stromspannungskurve. Der Strom wurde (vgl. Gleichung 11) aus dem Produkt von Einzelkanalstrom und Offenwahrscheinlichkeit bestimmt. Die dargestellten Punkte sind die Mittelwerte aus 4 verschiedenen Versuchen (2mM K_o). Für Spannungen kleiner als -40 mV konnten keine P_o-Werte ermittelt werden (vgl. Abb. 25); hier wurde der Verlauf der Kurve durch Extrapolation auf das Umkehrpotential des Einzelkanalstroms (E_{rev}) eingezeichnet (gestrichelte Gerade).

d. Blockierung durch Barium-Ionen

In Skelettmuskelfasern (Standen & Stanfield, 1978; Ohmori et al., 1981), Seesterneiern (Hagiwara et al., 1978), Tintenfischaxonen (Armstrong & Taylor, 1980; Eaton & Brodwick, 1980), Purkinjefasern (DiFrancesco, 1981 a; Carmeliet, 1982) und am Sinusknoten (Osterrieder et al., 1982b) verursachen Ba-Ionen eine spannungsabhängige Blockierung von einwärtsgleichrichtenden K-Strömen (vgl. Abb. 13 S. 62). Obwohl Ba-Ionen häufig verwendet werden, um derartige Ströme selektiv zu unterdrücken (z.B. DiFrancesco, 1981 a, b; Carmeliet, 1982; Glitsch et al., 1982; Isenberg et al., 1983) und damit die Analyse anderer Stromkomponenten zu erleichtern, ist über den Blockierungsmechanismus bisher wenig bekannt. Gerade Einzelkanaluntersuchungen sollten aber einen detaillierten Einblick in die bei der Blockierung durch Ba-Ionen ablaufenden molekularen Vorgänge gestatten. Daher wurde in der vorliegenden Untersuchung die Wirkung von Ba-Ionen auf den Einzelkanalstrom analysiert.

Die unter Kontrollbedingungen vergleichsweise langen Öffenereignisse werden in Gegenwart von Ba-Ionen (0,2 mM) in der Badlösung durch kurze, frequente Schließungen unterbrochen, wie in Abb. 24 durch den Vergleich zweier Originalregistrierungen gezeigt wird. Die in Gegenwart von Ba^{++} zusätzlich beobachteten Geschlossenereignisse lassen sich aufgrund ihrer zeitlichen Dauer und Häufigkeit sowohl von den Flickern als auch von den normalen Geschlossenereignissen unterscheiden.

Das Amplitudenhistogramm in Abb. 24 weist nach, daß die Stromamplituden des offenen und geschlossenen Zustands unverändert sind. Da auch keine zusätzlichen Maxima erscheinen, kommt es offenbar während der kurzen Schließungen, die im folgenden als Blockierungen bezeichnet werden, zu einer vollständigen Hemmung des Einzelkanalstroms. Unvollständige Schließungen, die bei anderen Kanälen unter bestimmten Bedingungen auftreten (die sogenannten "subconducting states"; Hamill & Sakmann, 1981), sind nicht beobachtet worden (vgl. die Ausschnittvergrößerung in Abb. 24).

Im Gegensatz zur Amplitude des Einzelkanalstroms ist die Öffenwahrscheinlichkeit in Gegenwart von Ba-Ionen deutlich reduziert. So nimmt im dargestellten Versuch (Abb. 24), wie aus

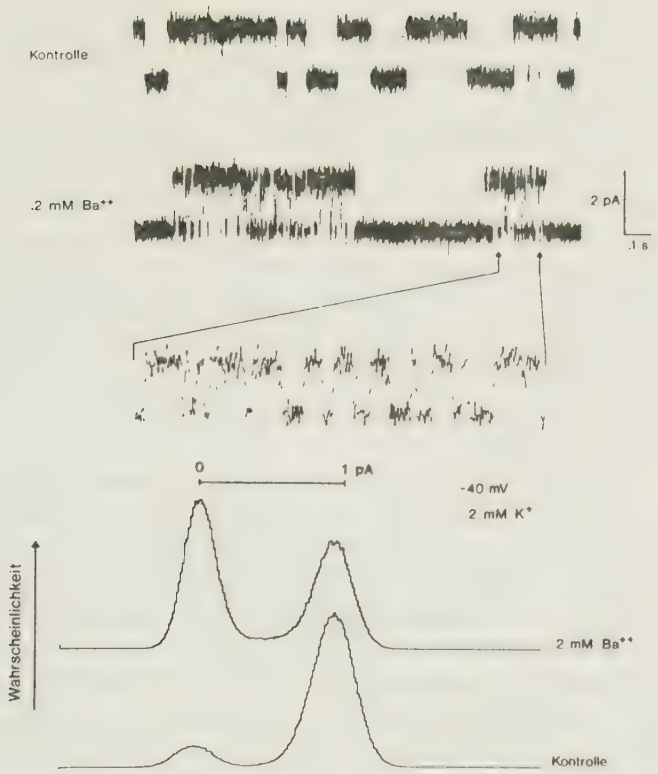


Abb. 24: Wirkung von Ba-Ionen auf den Einzelkanalstrom. In Gegenwart von 0,2 mM $BaCl_2$ werden die unter Kontrollbedingungen sichtbaren Offenereignisse (obere Spur) durch frequente, kurzzeitige und vollständige Schließungen unterbrochen (2mM K_o, Membranspannung 0 mV).
Die unterste Spur zeigt eine Ausschnittsvergrößerung bei zehnfacher zeitlicher Dehnung. Die Amplitudenhistogramme im unteren Teil der Abbildung weisen nach, daß in Gegenwart von Ba^{++} die Offenwahrscheinlichkeit bei unveränderten Amplituden des offenen (rechtes Maximum) und des geschlossenen Zustands reduziert wird (im vorliegenden Fall bei einem Membranpotential von -40 mV um ca. 50%).

dem Amplitudenhistogramm ersichtlich, die Offenwahrscheinlichkeit bei einem Membranpotential von -40 mV um ca. 50% gegenüber der Kontrolle ab. Die Abnahme der P_o-Werte ist von der Membranspannung abhängig, wie Abb. 25 anhand eines Vergleichs der Offenwahrscheinlichkeiten mit und ohne Ba^{++} zeigt. Unter Kontrollbedingungen (offene Kreise; Mittelwerte aus vier Versuchen) steigt P_o von etwa 0,1 bei +40 mV bei Veränderung der Membranspannung in negativer Richtung auf ca. 0,9 bei -40 mV an. Im Gegensatz hierzu wird unter dem Einfluß von Ba^{++} bei negativen Spannungen mit zunehmender Hyperpolarisation eine Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit sichtbar. Bei positiven Spannungen ist im Rahmen der Meßgenauigkeit kein Unterschied zur Kontrolle festzustellen.

Bezogen auf die rekonstruierte Stromspannungsbeziehung (vgl. Gleichung (11), S. 86) ergibt sich aus der veränderten Offenwahrscheinlichkeit die aus konventionellen Spannungsklemmuntersuchungen bekannte spannungsabhängige Blockierung des makroskopischen K-Stroms (Abb. 26). Während bei positiven Spannungen die beiden Kurven nahezu deckungsgleich verlaufen, kommt es bei zunehmender Hyperpolarisation zu einer verstärkten Reduzierung des Auswärtsstroms. Da Selektivität und Leitfähigkeit des Kanals in Gegenwart von Ba^{++} unverändert sind, müssen beide Kurven die Abszisse im selben Punkt, dem extrapolierten Umkehrpotential, schneiden. Die spannungsabhängige Reduzierung des Auswärtsstroms bedingt dabei gleichzeitig eine Abnahme der Einwärtsgleichrichtung. Eine vollkommene Linearisierung der Stromspannungsbeziehung, wie sie aus Untersuchungen mit der Spannungsklemme von multizellulären Präparaten bekannt ist (vgl. z.B. Glitsch et al., 1982), erfolgt erst bei höheren Ba-Konzentrationen.

Vergleicht man den Einfluß von Ba-Ionen auf die rekonstruierte Stromspannungsbeziehung in Abb. 26 mit den an der gesamten Zellen gemessenen Stromspannungsbeziehungen in Abb. 13, so wird wiederum ein hohes Maß an Übereinstimmung sichtbar. Der nahezu identische Verlauf der Stromspannungsbeziehungen unter vergleichbaren Versuchsbedingungen unterstützt die An-

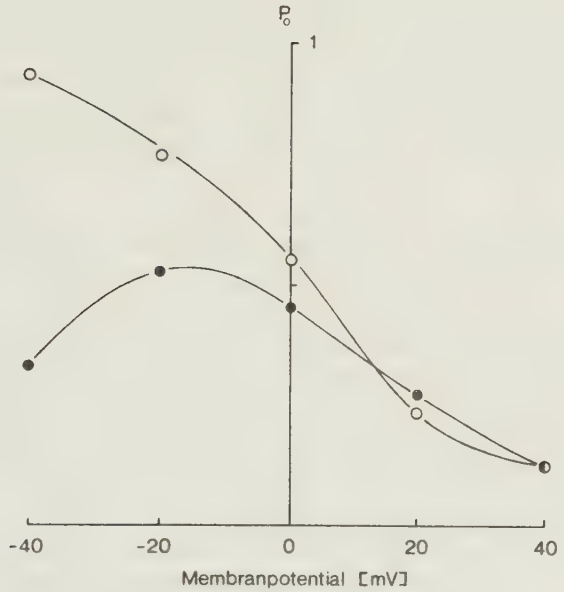


Abb. 25: Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit unter Kontrollbedingungen (o) und in Gegenwart von 0,2 mM $BaCl_2$ (2 mM K_o). Die Meßwerte der Kontrolle entsprechen den in Abb. 22 B gezeigten Mittelwerten; die in Gegenwart von Ba^{++} resultieren aus einem Experiment, bei dem eine Messung der P_o-Werte im gesamten Potentialbereich möglich war. Die Kurven wurden nach Augenmaß eingezeichnet.

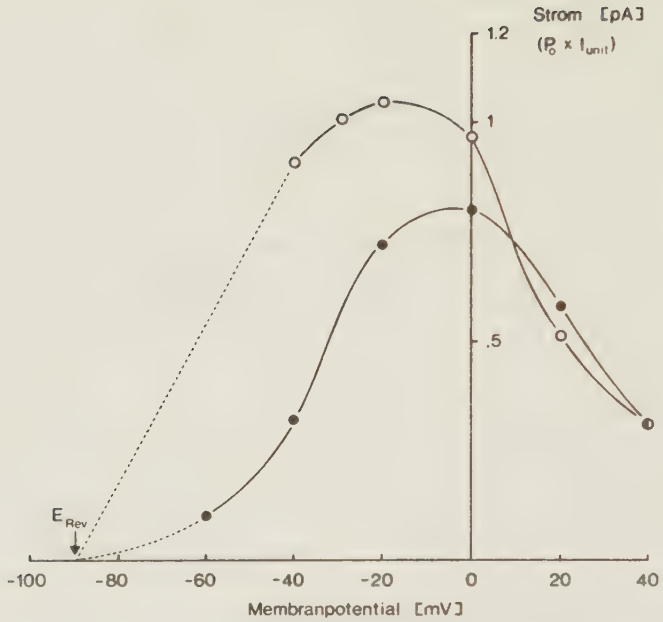


Abb. 26: Vergleich der rekonstruierten Stromspannungskurven in normaler Tyrodelösung (o; gleiche Werte wie in Abb. 23) und in Gegenwart von Ba-Ionen (gleiche Bedingungen wie in Abb. 25). Die Kurven basieren auf den in Abb. 25 dargestellten Offenwahrscheinlichkeiten und den entsprechenden Einzelkanalströmen (Kurven nach Augenmaß eingezeichnet).

nahme, daß der hier beschriebene K-Kanal an dem unter WCR-Bedingungen beobachteten K-Strom direkt beteiligt ist. Durch den direkten Vergleich der makroskopischen Stromspannungsbeziehungen mit den Einzelkanaluntersuchungen ist es möglich, typische Eigenschaften dieses K-Stroms, wie die Einwärtsgleichrichtung oder die Blockierung durch Ba-Ionen, auf charakteristische Eigenschaften der Einzelkanäle zurückzuführen und ursächlich zu verstehen.

Für die weitere kinetische Analyse des Ba-Blocks wurde ein Modell zugrunde gelegt, das in ähnlicher Form für die blockierende Wirkung von Lokalanästhetika am nikotinergen ACh-Kanal vorgeschlagen wurde (Neher & Steinbach, 1978). Dabei wird angenommen, daß die blockierenden Ionen an eine Bindungsstelle im geöffneten Kanal gelangen können und diese für eine gewisse Zeit, die Blockierungszeit, besetzen. Während dieser Zeit ist der Kanal in einem nichtleitenden Zustand, der jedoch nicht mit dem normalen geschlossenen Zustand identisch ist. Zur Beschreibung eines solchen Blockierungsmechanismus ist das einfache Reaktionsmodell (Gleichung (4), S.37) um einen Zustand, den blockierten (Z_b), zu erweitern. Wenn dieser Zustand nur aus dem offenen erreicht werden kann, wie später noch gezeigt wird, ergibt sich das folgende sequentielle Reaktionsmodell:

$$Z_g \underset{k_{o1}}{\overset{k_g}{\rightleftharpoons}} Z_o + Ba^{++} \underset{k_b}{\overset{k_{o2}}{\rightleftharpoons}} Z_b Ba^{++} \qquad (12)$$

Die drei möglichen Zustände sind der geschlossene (Z_g), der offene (Z_o) und der blockierte (Z_b). k_{o2}, k_b sind die Geschwindigkeitskonstanten des Übergangs vom offenen in den blockierten Zustand und umgekehrt, k_g, k_{o1} die des Übergangs vom geschlossenen in den offenen Zustand und zurück.
Mit Hilfe einer schematischen Einzelkanalregistrierung (Abb. 27) soll erläutert werden, wie aus den Verteilungen der Offen- und Geschlossenereignisse die Bestimmung der verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten erfolgen kann. Der Kanal geht bei 1 vom geschlossenen in den offenen Zustand über und bleibt bis zur Blockierung bei 2 geöffnet. Nach Ablauf der Blockierungs-

zeit (t_b) kommt es zum Zeitpunkt 3 zu einem erneuten Öffnen des Kanals. In stetigem Wechsel wiederholen sich anschließend Blockierung und deren Aufhebung, bis der Kanal bei 4 wieder in den geschlossenen Zustand zurückfällt. Eine solche Folge kurzzeitiger Schließungen und Öffnungen, die durch längere Geschlossenperioden getrennt sind, bezeichnet man als Burst (vgl. u.a. Colquhoun & hawkes, 1981, 1982) mit der Dauer t_{Burst} und die Zeiten zwischen einzelnen Bursts als Interbursts ($t_{Interburst}$).

Die Übergänge vom geschlossenen und geblockten Zustand in den offenen sind nur von den betreffenden Geschwindigkeitskonstanten abhängig; es gilt $k_g = 1/\tau_g$ und $k_b = 1/\tau_b$ mit τ_g, τ_b als exponentielle Zeitkonstanten der Blockierungs- bzw. normalen Geschlossenereignisse. Da diese beiden geschlossenen Zustände aufgrund ihrer identischen Stromamplituden nicht unterscheidbar sind, müssen die Zeitkonstanten τ_b und $\tau_g = \tau_{Interburst}$ aus der Verteilung aller Geschlossenereignisse abgeleitet werden.

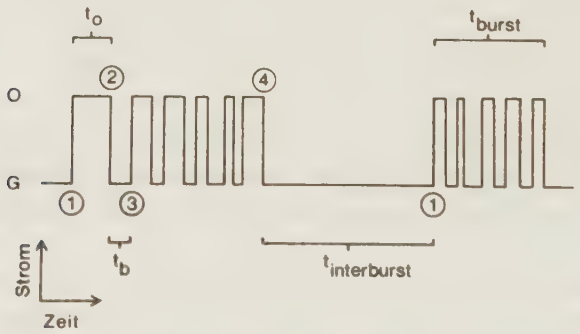


Abb. 27: Schematische Darstellung einer Einzelkanalableitung in Gegenwart von blockierenden Ba-Ionen (weitere Erläuterungen im Text; verändert nach Neher & Steinbach, 1978)

Betrachtet man N_S unabhängig ausgewählte Geschlossenereignisse einer Ableitung (vgl. Abb. 24) mit nur einem aktiven Kanal, so ergibt sich in Analogie zu Gleichung (7) für die Anzahl der Ereignisse N(t), die zur Zeit t=0 geöffnet haben und die zur Zeit t noch andauern:

$$N(t) = N_{Interburst}(t) + N_b(t) = N_{0Interburst} \exp(-t/\tau_g) + N_{0b} \exp(-t/\tau_b) \qquad (13)$$

$$\text{mit } N_S = N_{0Interburst} + N_{0b}$$

$N_{0Interburst}$, N_{0b} sind die Anzahl der Interburst- bzw. Blockierungsereignisse. Für den Fall, daß sich τ_g und τ_b hinreichend unterscheiden (mindestens um den Faktor 5-10), lassen sich aus der halblogarithmischen Auftragung der angegebenen Verteilung beide Zeitkonstanten bestimmen, indem zunächst die Regressionsgerade für den langsamen Prozeß bestimmt wird (vgl. 28 A). Durch Extrapolation dieser Geraden auf die Ordinate kann die Anzahl der Interburstereignisse ermittelt werden. Durch Subtraktion der so berechneten Verteilung der Interburstereignisse von der Gesamtverteilung ergibt sich die Verteilung der Blockierungsereignisse. Daraus kann durch exponentielle Regression die Blockierungszeitkonstante τ_b bestimmt werden.

Vom offenen Zustand kann das System alternativ in den blockierten oder geschlossenen Zustand übergehen; bei der Veränderung des offenen Zustands muß daher die Summe der beiden Geschwindigkeitskonstanten berücksichtigt werden, die von diesem Zustand wegführen sowie die Konzentration des blockierenden Ions. Für die Verteilung von N(t) Offenereignissen ergibt sich daher:

$$N(t) = N_0 \exp(-k_{o1} + k_{o2}\, c_{Ba}\, t)$$
$$\text{mit } \tau_o = (k_{o1} + k_{o2}\, c_{Ba})^{-1} \qquad (14)$$

Die Geschwindigkeitskonstante der Blockierung ist dabei von der

Konzentration der blockierenden Ba-Ionen (c_{Ba}) abhängig. Sie besitzt daher im Unterschied zu den übrigen Geschwindigkeitskonstanten die Einheit $s^{-1}M^{-1}$.

Unter der vereinfachten Annahme, daß das Gleichgewicht zwischen der Blockierung und ihrer Aufhebung im Burst sich im Vergleich zum Übergang in den geschlossenen Zustand relativ schnell einstellt, d. h., die Offen- und Blockierungszeitkonstanten in Gegenwart von Ba-Ionen sehr klein gegenüber der normalen Offenzeitkonstanten sind (vgl. Abb. 24), so ergibt sich für die Burstzeitkonstante τ_{Burst}:

$$\tau_{Burst} = (k_{o1})^{-1} \left(1 + \frac{k_{o2}\, c_{Ba}}{k_b}\right) \qquad (15)$$

Gleichung (15) beinhaltet, daß für das angenommene Modell die Summe der Offenzeiten im Burst im Mittel der Dauer der Offenereignisse unter Kontrollbedingungen entspricht und τ_{Burst} daher um den Anteil der Blockierungszeiten länger als das τ_o der Kontrolle ist.

Die Voraussagen des Modells, an denen die Richtigkeit überprüft werden kann, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. In der Verteilung der Geschlossenzeiten lassen sich zwei Komponenten ($\tau_{Interburst}$ und τ_b) unterscheiden.
2. $\tau_{Interburst}$ ist dabei mit τ_g unter Kontrollbedingungen identisch.
3. Die Offenereignisse sind einfach exponentiell verteilt, ihre Dauer hängt von der Ba-Konzentration ab.
4. Die Burstdauer (τ_{Burst}) ist im Mittel um den Anteil der Blockierungszeiten länger als die Offenzeitkonstante unter Kontrollbedingungen. Die Richtigkeit der Voraussagen 2. und 4. schließen einen Übergang vom blockierten in den geschlossenen Zustand und umgekehrt aus, d. h. Ba-Ionen besetzen oder verlassen die Bindungsstelle nur im offenen Zustand.
5. Wenn die Bindungsstelle für Ba-Ionen im Kanal selbst und damit im elektrischen Feld liegt, müssen k_{o2} und k_b ähnlich den Konstanten k_{o1}, k_g eine Spannungsabhängigkeit besitzen.

Die im folgenden vorgestellten Daten beziehen sich im wesentlichen auf einen Versuch, in dem es möglich war, an einem Kanal Messungen bei verschiedenen Spannungen unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von Ba^{++} durchzuführen. In anderen Experimenten gelangen weniger vollständige Messungen; die erzielten Ergebnisse stimmten jedoch mit den Befunden des dargestellten Versuchs im Rahmen der Variabilität zwischen den einzelnen Kanälen überein.

Abb. 28 A zeigt aus diesem Experiment die halblogarithmisch aufgetragene Verteilung der Geschlossenereignisse unter Kontrollbedinungen (□) und in Gegenwart von 0,2 mM Ba^{++} in der Badlösung. Unter dem Einfluß von Ba^{++} wird neben der langen Zeitkonstanten ($\tau_g = \tau_{Interburst}$) eine weitere ($\tau_b$) sichtbar. Die Zeitkonstante der Interburstereignisse ($\tau_{Interburst}$ = 119 ms) ist mit der der Geschlossenereignisse in normaler Tyrodelösung (τ_g = 126 ms), die sich in diesem Experiment sehr gut durch eine einfache exponentielle Verteilung beschreiben ließen, nahezu identisch. Auch bei anderen Spannungen ergab sich diese Übereinstimmung, so daß die Voraussagen 1. und 2. erfüllt sind.

Nach Subtraktion der langsamen Komponente zeigt die verbleibende Verteilung einen einfachen exponentiellen Verlauf (Abb. 28 B) mit einer Zeitkonstanten τ_b = 3,5 ms, der mittleren Blokkierungszeit. Die halblogarithmische Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten $k_b = 1/\tau_b$ gegen die Membranspannung (Abb. 30 ausgefüllte Kreise) weist die exponentielle Spannungsabhängigkeit dieser Konstanten nach. Für eine e-fache Änderung der Geschwindigkeitskonstanten wird eine Änderung des Membranpotentials um ca. 100 mV benötigt.

Die Verteilung der Offenereignisse, dargestellt in Abb. 29, läßt auch in Gegenwart von Ba-Ionen nur einen einfachen exponentiellen Verlauf erkennen. In einem anderen Versuch wurde qualitativ nachgewiesen, daß τ_o von der Ba-Konzentration abhängt. So nahmen die Offenzeiten während der langsamen Konzentrationsanflutung nach Wechsel auf eine Ba-haltige Perfusionslösung kontinuierlich ab, wohingegen die Blockierungszeiten un-

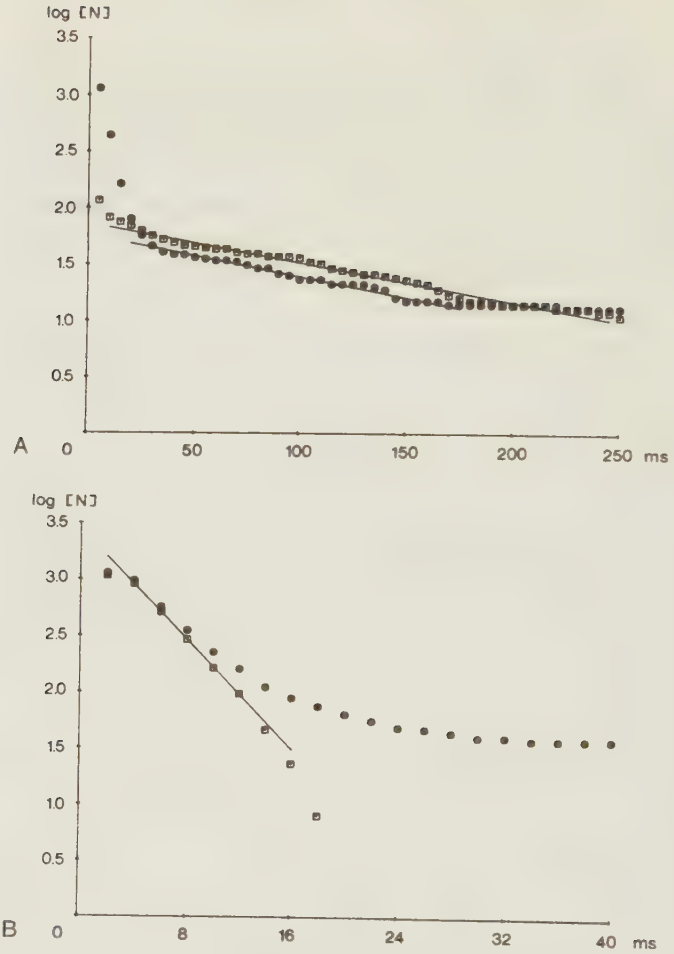


Abb. 28: Vergleich der Geschlossenzeitenverteilungen unter Kontrollbedingungen (□) und in Gegenwart von 0,2 mM $BaCl_2$ (●) (A; 2 mM K_o; Membranpotential 0 mV; Auftragung der Ereignisse wie in Abb. 21). Unter dem Einfluß von Ba^{++} kommt es zur Ausprägung einer zusätzlichen, schnellen Komponente. Diese ist in B durch Subtraktion der langsamen Komponente von der Gesamtverteilung getrennt dargestellt (□). Die aus der exponentiellen Regression ermittelten Zeitkonstanten betragen τ_g = 126 ms bei der Kontrolle (A, □) und $\tau_{Interburst}$ = 119 ms und τ_b = 3,57 ms in Gegenwart von Ba-Ionen.

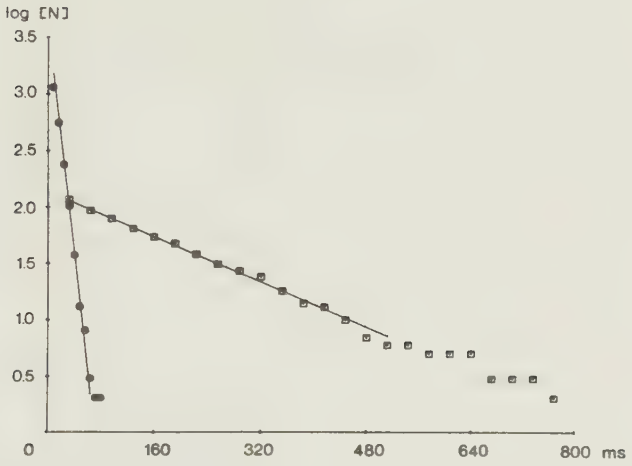


Abb. 29: Verteilung der Offenzeiten in normaler Tyrodelösung (□) und unter dem Einfluß von Ba^{++} (●) (Auftragung und Bedingungen wie in Abb. 28). In beiden Fällen lassen sich die Verteilungen durch einen einfachen exponentiellen Verlauf anpassen; die Zeitkonstanten betragen τ_o = 199 ms für die Kontrolle und τ_o = 8,58 ms unter Ba-Einfluß.

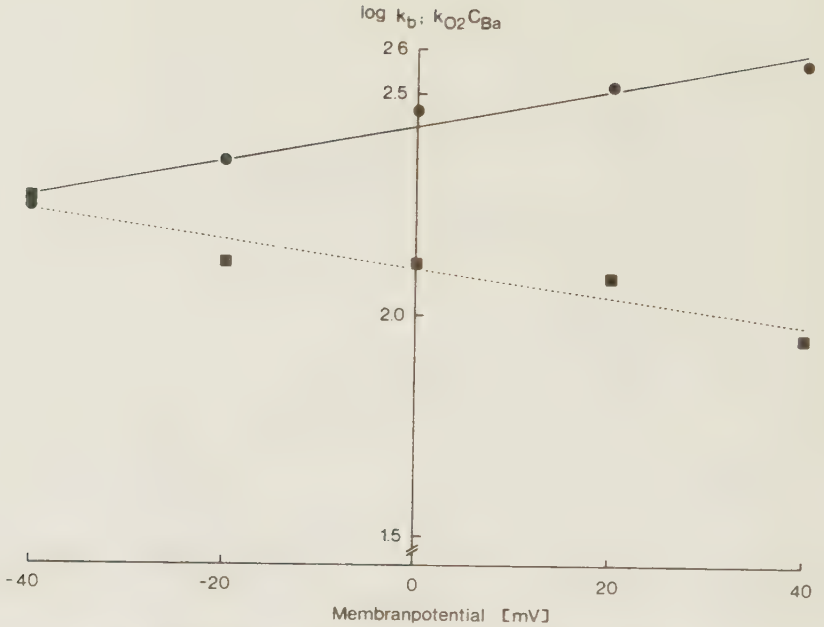


Abb. 30: Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- ($k_{O2}\ c_{Ba}$ mit c_{Ba}= 0,2 mM; ■) und Rückreaktion (k_b; ●) der Blockierung durch Ba-Ionen. Die halblogarithmisch aufgetragenen Meßpunkte lassen sich durch lineare Regression anpassen (weitere Erläuterungen im Text).

verändert blieben.

Aus der Offenzeitkonstanten läßt sich nach Gleichung (14) die konzentrationsabhängige Geschwindigkeitskonstante der Blockierungsreaktion (k_{o2}) ermitteln, wenn die Geschwindigkeitskonstante des Übergangs in den geschlossenen Zustand (k_{o1}) bekannt ist. Zur Berechnung der k_{o2}-Werte, die in Abb. 30 für die verwendete Ba-Konzentration halblogarithmisch gegen die Membranspannung aufgetragen sind, wurde für k_{o1} folgende Beziehung angenommen: $k_{o1} = 5 \exp(0{,}037V)\ s^{-1}$ (V = Membranpotential in mV). Dabei wurde die bei 0 mV unter Kontrollbedingungen gemessene Geschwindigkeitskonstante $k_{o1}(0) = 5\ s^{-1}$ mit der mittleren Spannungsabhängigkeit der Offenzeitkonstanten aus Abb. 22 A versehen. Wie Abb. 30 zeigt, besitzt die Hinreaktion der Blockierung trotz höherer Streuung der Meßwerte, die zum Teil auf der näherungsweisen Abschätzung der K_{o1}-Werte beruht, etwa die gleiche Spannungsabhängigkeit mit umgekehrter Richtung wie die Rückreaktion. Aus der Richtung der Spannungsabhängigkeit der beiden Konstanten kann geschlossen werden, daß das blockierende Ba-Ion die Bindungsstelle im Kanal von außen erreicht und auch wieder nach außen verläßt.

Durch die Vorgabe einer minimalen Geschlossenzeit bei der Auswertung kann aus der Verteilung der Offenzeiten die Burstdauer (τ_{Burst}) ermittelt werden, wenn sich $\tau_{Interburst}$ und τ_b hinreichend unterscheiden, wie dies normalerweise für Spannungen >0 mV der Fall ist. Die minimale Geschlossenzeit (ca. 15-30 ms) wurde dabei so gewählt, daß die Anzahl der ausgewerteten Burstereignisse (N_{0Burst}) mit der der Interburstereignisse ($N_{0Interburst}$) annähernd übereinstimmte. In Tab. 4 werden die Burstdauern mit den Offenzeitkonstanten der Kontrolle und mit den nach Gleichung (15) berechneten Werten verglichen.

Der Vergleich der Burstzeitkonstanten mit der Offenzeitkonstanten der Kontrolle zeigt, daß zwei weitere, wesentliche Voraussagen des sequentiellen Reaktionsmodells erfüllt sind. Erstens ist die mittlere Burstdauer immer deutlich größer als die mittlere Offenzeit unter Kontrollbedingungen und zweitens läßt sich die tatsächliche mittlere Burstdauer nach Gleichung (15) aufgrund der bestimmten Geschwindigkeitskonstanten vorher-

Tab. 4: Vergleich der mittleren Burstdauern und Offenzeitkonstanten (Angaben in ms)

	0 mV	+ 20 mV
Burstzeitkonstante (0,2 mM Ba^{++}, aus der Verteilung bestimmt)	289	115
Offenzeitkonstante (normale Tyrodelösung)	199	78
nach Gleichung (15) berechnete Burstdauer	292	112

sagen. Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß alle Voraussagen des Modells (12) verifiziert werden konnten.

Bei der Annahme einer Ba-Bindungsstelle im elektrischen Feld der Membran sollte die Dissoziationskonstante (K_D; in M) spannungsabhängig sein. Es gilt in Analogie zu Gleichung (9):

$$K_D = k_b/k_{o2} = c_{Ba} \cdot P_{o\ Burst}/(1 - P_{o\ Burst}) \qquad (16)$$

$P_{o\ Burst}$ ist dabei die Offenwahrscheinlichkeit innerhalb des Bursts. Für die Spannungsabhängigkeit läßt sich aus der Boltzmann-Verteilung entsprechend Gleichung (10) im einfachsten Fall folgender Zusammenhang ableiten (vgl. Woodhull, 1973; Neher & Steinbach, 1978; Latorre & Miller, 1983):

$$K_D(V) = K_D(0) \cdot \exp\ (n \cdot z \cdot F \cdot V/R \cdot T) \qquad (17)$$

$K_D(0)$ kennzeichnet den Wert der Dissoziationskonstanten bei einer Membranspannung von 0 mV; n gibt den Teil der Gesamtmembranspannung an, der am z-fach geladenen, blockierenden Ion wirksam wird, wenn es sich zur Bindungsstelle bewegt oder von ihr entfernt.

In Abb. 31 wurde der Quotient aus Offen- und Geschlossenwahrscheinlichkeit innerhalb der Bursts für die untersuchte Ba-Konzentration halblogarithmisch gegen die Spannung aufgetragen. Dieser Quotient entspricht dem Verhältnis von Dissoziationskonstanten zur untersuchten Konzentration ($P_{o\ Burst}/(1 - P_{o\ Burst}) = K_D/c_{Ba}$); für $K_D(0)$ läßt sich hieraus ein Wert von 0,53 mM bestimmen. Obwohl eine deutliche Spannungsabhängigkeit der Dissoziationskonstanten vorhanden ist, führt die lineare Regression der Meßpunkte nur zu einer unzureichenden Anpassung. Insbesondere die Offenwahrscheinlichkeiten im Bereich positiver Membranspannungen sind aufgrund der hier vorkommenden, stark verkürzten Burstdauer und der damit verbundenen geringen Analysezeit mit einem großen Fehler behaftet.

Um trotzdem eine Abschätzung der Spannungsabhängigkeit der Dissoziationskonstanten als Hinweis auf die Lokalisation der Ba-Bindungsstelle zu erzielen, wurde die eindeutige Spannungsabhängigkeit der Blockierungszeitkonstanten zugrunde gelegt. Unter der Annahme, daß die Hin- und Rückreaktion der Blockierung im gleichen Maß von der Membranspannung abhängig sind (vgl. Abb. 30), wurde die exponentielle Spannungsabhängigkeit der Dissoziationskonstanten ermittelt und in Abb. 31 zum Vergleich als gestrichelte Gerade eingezeichnet. Die gestrichelte Gerade weist bezogen auf F/RT eine Steigung von ca. 0,5 auf. Die Ba-Bindungsstelle müßte aufgrund dieser Schätzung unter "konstant-field"-Bedingungen und unter der Voraussetzung, daß ein Ba-Ion zur Blockierung des Kanals ausreicht, von der Membranaußenseite gesehen auf ca. 1/4 der Membrandicke bzw. der Kanallänge lokalisiert sein.

Diese erste Analyse des Ba-Blocks auf der Ebene eines Einzelkanals ist insbesondere in Hinsicht auf die Affinität der Bindungsstelle noch unvollständig. Für eine endgültige Bestätigung des vorgeschlagenen Modells sind daher noch weitere Versuche erforderlich.

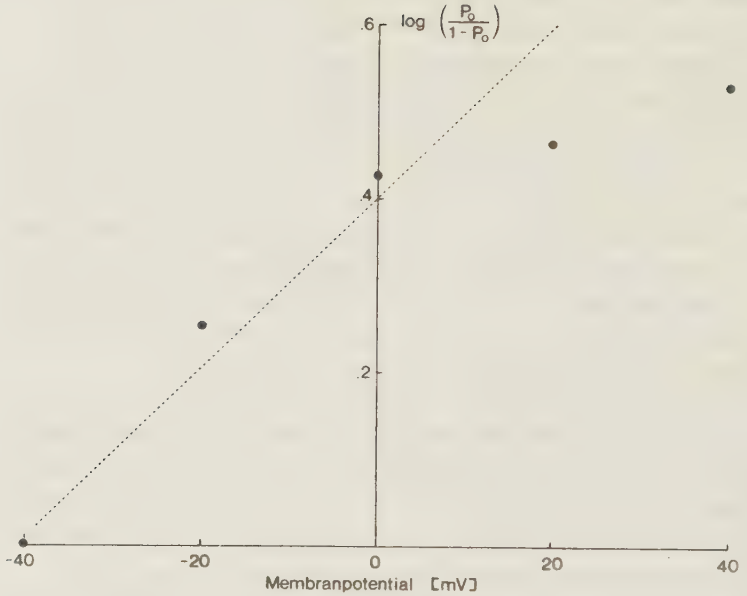


Abb. 31: Halblogarithmische Auftragung des Quotienten aus Offen- und Geschlossenwahrscheinlichkeit innerhalb der Bursts (entspricht nach Gleichung (16) dem Quotienten K_D/c_{Ba} mit c_{Ba} = 0,2 mM). Die Meßwerte können nicht zufriedenstellend durch eine Regressionsgerade angepaßt werden. Die gestrichelte Gerade zeigt den aufgrund der Spannungsabhängigkeit der Rückreaktion (vgl. Abb. 30: Auftragung von k_b) erwarteten Verlauf der Regressionsgeraden.

IV. DISKUSSION

Zellisolierung und -kultivierung

Im Unterschied zu den bisher erschienenen Publikationen über die Isolierung und Kultivierung adulter, ausdifferenzierter Herzzellen, die sich alle mit Ventrikelzellen beschäftigen (Claycomb & Palazzo, 1980; Schwarzfeld & Jacobson, 1981; Piper et al., 1982), wird in der vorliegenden Arbeit die Isolierung und Kultivierung adulter Vorhofzellen beschrieben. Wie Piper et al. in ihrer Untersuchung diskutieren, liegt der Vorteil der Kultur ausdifferenzierter Zellen darin, daß diese sich besser als Objekt zur Untersuchung physiologischer Fragen des adulten Herzens eignen als die häufig verwendeten und einfacher herzustellenden Kulturen embryonalen Ursprungs. Die adulten Herzzellen in Kultur sind ausdifferenziert, sie teilen sich folglich nicht mehr und können so leicht von anderen, kontaminierenden Zellen, wie proliferierenden Fibroblasten, unterschieden werden. Im Unterschied zu embryonalen Zellkulturen bleiben die Zellen über einen längeren Zeitraum voneinander separiert und sind besonders gut für elektrophysiologische Versuche an Einzelzellen geeignet.

Während Ventrikelzellen bei geeigneter, schonender Isolierung über einen Zeitraum von 5-7 Tagen unter Kulturbedingungen ihre ursprüngliche, brikettartige Gestalt beibehalten (vgl. Piper et al., 1982), besitzen die Vorhofzellen offenbar eine höhere Potenz, den einmal erzielten Grad der Differenzierung rückgängig zu machen und ihre Gestalt den Bedingungen in der Zellkultur anzupassen. Die Änderung der Zellmorphologie von der ursprünglich langgestreckten, spindelförmigen Gestalt über die sphärischen "Cardioballs" bis zum völlig abgeflachten Stadium sowie die zunehmende Spontanaktivität deuten auf eine intermediäre Stellung hin, die die Vorhofzellen zwischen den embryonalen einerseits und den Ventrikelzellen andererseits einnehmen. Die oben beschriebenen Vorgänge sind auch bei embryonalen bzw. neonatalen Ventrikelzellen unter Kulturbedingungen

zu beobachten; sie vollziehen sich hierbei jedoch innerhalb von ca. 24 Stunden (De Haan, 1967; Halle & Wollenberger, 1968).

Das Abrunden der isolierten Vorhofzellen in der Kultur ist grundsätzlich von den Vorgängen zu unterscheiden, die bei der Isolierung der Zellen aufgrund einer Schädigung (Ca-Paradox) zum Abrunden und zur Hyperkontraktur der Zellen führen können (vgl. Isenberg & Klöckner, 1982 a). Eine solche Hyperkontraktur während oder im Anschluß an die Isolierung ist immer mit spontanen Kontraktionen und der Bildung von Membranblasen verbunden. Selbst Zellen, die unter physiologischen Bedingungen nicht spontanaktiv sind, zeigen dann regelmäßige Kontraktionen, die lange für ein Zeichen besonderer Lebensfähigkeit der Zellen gehalten wurden (vgl. Glick et al., 1974; Clark et al., 1978). Im Gegensatz dazu war im Rahmen der vorliegenden Untersuchung eine erfolgreiche Kultivierung der Zellen nur dann möglich, wenn diese nach der Isolierung langgestreckt waren und keine bzw. nur seltene spontane Kontraktionen zeigten. Bei Zellen, die nach der Isolierung heftig kontrahierten, konnten regelmäßig lichtmikroskopisch erkennbare Schädigungen (Bildung von Membranblasen, granuläre Struktur des Zellinhaltes) beobachtet werden. Die meisten dieser Zellen zerfielen innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Isolierung. Die Möglichkeit einer Kultivierung der Zellen kann daher, neben den elektrophysiologischen Befunden, als Kriterium für die Lebensfähigkeit und Intaktheit der isolierten Vorhofzellen gewertet werden.

Das Problem der Ca-Empfindlichkeit (vgl. Altschuld et al., 1980; Haworth et al., 1980; Isenberg & Klöckner, 1982 a) läßt sich mit der angegebenen Isolierungs- und Kultivierungsmethode auf einfache Weise lösen. Wie Altschuld et al. darlegen, beruht das "Ca-Paradox" offenbar auf einer mangelhaften Energieversorgung der Zellen und der damit verbundenen Schwierigkeit, die niedrige intrazelluläre Ca-Konzentration (Ca_i) in physiologischen Lösungen aufrechtzuerhalten. Ein Anstieg der Ca_i, u.a. ausgelöst durch eine Hyperpermeabilität der Membran während der Perfusion mit Ca-freier Lösung, aktiviert die Kontraktion und führt zu einer weiteren Verschlechterung der Ener-

gieversorgung. Als Folge brechen schließlich die Ionengradienten über der Membran zusammen. Alle Maßnahmen, die die Energieversorgung der Zellen verbessern und die Aufrechterhaltung der niedrigen Ca_i fördern, begünstigen die Ca-Toleranz der Zellen:

1. Die Zellen sollten möglichst während der gesamten Isolierung nicht unter 30° C abgekühlt werden. Bei einer Abkühlung wurde immer ein erhöhter Anteil spontanaktiver Zellen beobachtet.
2. Eine graduelle Erhöhung der Ca_o schon während der Perfusion mit der Enzymlösung verhindert eine Hyperpermeabilität der Zellmembran.
3. Vorsichtiges Pipettieren reduziert eine mögliche mechanische Reizung der Zellen; ein erhöhter Energieverbrauch infolge einer Kontraktionstätigkeit der Zellen wird unterbunden.

Als unbrauchbar erwies sich die von Isenberg & Klöckner (1982 a) vorgeschlagene Inkubation der Zellen in "Kraftbrühe", die die obigen Maßnahmen ins Gegenteil verkehrt, d.h., die Zellen werden in dieser Lösung depolarisiert und abgekühlt.

Bezüglich der verwendeten Enzyme hat sich der Einsatz der angegebenen Kombination besonders bewährt. Beim Einsatz zusätzlicher Proteasen muß zwischen der Forderung nach einem möglichst vollständigen Abbau des Bindegewebes und einer gleichzeitig entstehenden Schädigung wichtiger Membranenzyme der Herzzellen abgewogen werden, da ein zu weitreichender Abbau (z.B. durch eine zu lange Perfusionsdauer mit der Enzymlösung) eine erfolgreiche Zellkultivierung verhindert.

Elektrophysiologische Eigenschaften der frisch isolierten Zellen

Die in der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Ergebnisse unterstützen die Befunde anderer elektrophysiologischer Untersuchungen an isolierten, adulten Herzzellen (Powell et al., 1980; Hume & Giles, 1981; Isenberg & Klöckner, 1982 a, b, c; Irisawa & Kokubun, 1983). In bezug auf Ruhe- und Aktionspotential, Transmitterempfindlichkeit sowie weiterer Membraneigenschaften wurden keine wesentlichen Abweichungen von den zitier-

ten Veröffentlichungen festgestellt.

Im Vergleich zu den isolierten Ventrikelzellen sind die Vorhofzellen etwa um den Faktor 10 kleiner; ihre Größe entspricht weitgehend den isolierten Froschvorhofzellen (vgl. Hume & Giles, 1981). Diese geringe Größe, verbunden mit der für elektrophysiologische Untersuchungen ungünstigen Gestalt der Vorhofzellen, erschweren die Ableitung und lassen die Zellen für routinemäßige Untersuchungen als ungeeignet erscheinen.

In der vorliegenden Untersuchung ist auf eine möglichst exakte Bestimmung der Membranfläche außer einer näherungsweisen Schätzung bewußt verzichtet worden, da die bloße lichtmikroskopische Vermessung insbesondere wegen eventuell nicht sichtbarer Membraneinstülpungen als zu ungenau erschien. Die kapazitive Bestimmung der Membranfläche unter der Annahme einer spezifischen Membrankapazität von $1\mu F/cm^2$ liefert hingegen offensichtlich einen zuverlässigen Wert. Dies wird durch die exakte Übereinstimmung des daraus resultierenden spezifischen Widerstands mit den Angaben anderer Autoren deutlich.

Die Messungen der Aktionspotentiale zeigen, daß bei Einzelzelluntersuchungen die Zusammensetzung der Pipettenlösung einen entscheidenden Einfluß auf die elektrischen Eigenschaften der Zellmembran hat (vgl. Irisawa & Kokubun, 1983). Das Aktionspotential liefert dabei ein besonders empfindliches Kriterium für Veränderungen der intrazellulären Bedingungen, da für den Ablauf des Aktionspotentials das geordnete Zusammenwirken der verschiedenen Ströme notwendig ist. So rufen Veränderungen der intrazellulären Ca-Konzentration und der Energieversorgung deutliche Aktionspotentialveränderungen hervor. Die Ursache dieser Veränderungen soll im Zusammenhang mit der Induzierung des K-Stroms näher besprochen werden.

Die ungeänderte Empfindlichkeit der Zellen für ACh und Ba-Ionen bekräftigt noch einmal ihre physiologische Intaktheit und Lebensfähigkeit.

Ganzzelluntersuchungen an den kultivierten Vorhofzellen

Für eine Anwendung der verschiedenen Ableitkonfigurationen

der verbesserten Patch-clamp-Technik nach Hamill et al. (1981) müssen von seiten des Untersuchungsobjekts bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein. Die zu untersuchenden Zellen sollten möglichst von geringer Größe (Durchmesser ca. 10-20 µm) sein, um in der WCR-Ableitung die Membran homogen klemmen zu können; sie sollten festsitzen, um eine Herstellung isolierter Membranstücke zu ermöglichen, und ihre Membranoberfläche sollte möglichst sauber sein. Diese Bedingungen sind beispielsweise in idealer Weise bei kultivierten chromaffinen Zellen verwirklicht (vgl. Fenwick et al., 1982). Für Patch-clamp-Untersuchungen an Herzzellen wurden bisher kultivierte, neonatale Herzzellen (Colquhoun et al., 1981; Reuter et al., 1982; Cachelin et al., 1983) und frisch isolierte, adulte Herzzellen (Trube et al., 1981; Cavalie & Trautwein, 1983; Pelzer & Ochi, 1983; Sakmann et al., 1983) verwendet. Die Cardioballs scheinen im Vergleich zu den beiden genannten Präparationen für Untersuchungen mit der verbesserten Patch-clamp-Technik besser geeignet zu sein:

1. Allein die Cardioballs besitzen eine sphärische Gestalt mit einem so geringen Zelldurchmesser, daß die Durchführung von Spannungsklemmversuchen mit einer Patchpipette möglich wird.
2. Im Unterschied zu den neonatalen Herzzellen bleiben die Cardioballs in Kultur während der ersten 10 Tage voneinander separiert und ermöglichen daher Einzelzelluntersuchungen.
3. Gegenüber den frisch isolierten Zellen besitzen die Cardioballs die Vorteile, daß sie am Boden der Kulturschalen fest anwachsen und aufgrund der Kultivierung leichter verfügbar sind.

Bei der Kultivierung der Vorhofzellen kommt es neben den morphologischen Umgestaltungen auch zu Änderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften, wie der zunehmende Anteil spontanaktiver Zellen schon vermuten läßt. Bei einer Bewertung der vorliegenden Untersuchungen an Cardioballs muß man berücksichtigen, daß alle Messungen bei Zimmertemperatur erfolgten,

um an derselben Zelle auch die Registrierung der schnellen Einzelkanalereignisse zu ermöglichen. Die niedrigere Temperatur sollte erwartungsgemäß in erster Linie kinetische Veränderungen, wie Verlangsamung der spontanen Erregungsbildung, Verlängerung des Aktionspotentials und der Einzelkanalereignisse bewirken. Der Einfluß auf das Ruhepotential, die Amplituden der Aktionspotentiale und der einzelnen Ströme sollte hingegen geringer sein (vgl. Illanes et al., 1970).

Die steady-state Stromspannungsbeziehungen ergeben einen ersten Hinweis auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Cardioballs. Die steady-state Stromspannungsbeziehungen der Cardioballs zeigen den für Herzpräparate typischen Verlauf: stark zunehmende Einwärtsströme bei Spannungen negativer als E_K, einen flachen, hochohmigen Abschnitt im Bereich vom E_K bis ca. -20 mV und bei positiveren Spannungen zunehmende Auswärtsströme. Die Kurven lassen keinen Bereich negativen Widerstands mit verschiedenen Nulldurchgängen erkennen, wie dies für den Purkinjefaden unter bestimmten Bedingungen charakteristisch ist (vgl. Carmeliet & Vereecke, 1979; Carmeliet, 1982). Die Stromspannungsbeziehung gleicht vielmehr denen von Sinus- oder AV-Knotenzellen (u.a. Seyama, 1976; Kokubun et al., 1982).

Auch Untersuchungen an isolierten, adulten Herzzellen weisen unter bestimmten Versuchsbedingungen ähnliche steady-state Stromspannungsbeziehungen auf (Isenberg & Klöckner, 1982 c; Belardinelli & Isenberg, 1983; Hume & Giles, 1983; Irisawa & Kokubun, 1983). Unterschiede - insbesondere in bezug auf die Ausprägung eines Bereichs negativen Widerstands - könnten auf einer nicht inaktivierten Komponente des langsamen Einwärtsstroms (I_{si}) beruhen, die in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen (intrazelluläre Lösung, Anwesenheit von Blockern) im Bereich von -30 bis +20 mV mit einem unterschiedlichen Beitrag an der steady-state Stromspannungsbeziehung beteiligt ist. Da an den Cardioballs unter den gewählten Bedingungen aber kein langsamer Einwärtsstrom beobachtet wurde, fehlt diese Komponente vollständig.

Aus dem flachen Verlauf der Stromspannungsbeziehung im Po-

tentialbereich positiver als E_K bis ca. -20 mV erklärt sich die hohe Variabilität im Ruhepotential der Zellen. Schon geringe Ströme (von wenigen pA) genügen, um das Ruhepotential in die eine oder andere Richtung zu verschieben. Das insgesamt niedrigere Ruhepotential im Vergleich zu den frisch isolierten Vorhofzellen deutet auf ein erhöhtes P_{Na}/P_K-Verhältnis der Cardioballs hin. Auch in diesem Punkt ist ein Vergleich der Cardioballs mit anderen zur Spontanaktivität befähigten Zellen gerechtfertigt (vgl. Weidmann, 1974 ; Noma & Irisawa, 1975; Sperelakis, 1979).

Das hohe P_{Na}/P_K-Verhältnis muß auch im Zusammenhang mit dem hohen Zelleingangswiderstand betrachtet werden. Abschätzungen der Membranfläche der Cardioballs aufgrund von Kapazitätsmessungen und einer geometrischen Berechnung der Zelloberfläche (Annahme einer Kugel mit einem Durchmesser von 15-30 µm) ergaben im Vergleich zu den frisch isolierten Vorhofzellen keine wesentlichen Abweichungen. Bei unveränderter Membranfläche kann aber eine Zunahme im Eingangswiderstand nur auf einer Reduzierung der Membranleitfähigkeit, insbesondere für K-Ionen, beruhen. Eine solche Abnahme der K-Leitfähigkeit während der "Dedifferenzierung" der Zellen unter Kulturbedingungen steht im Einklang mit Untersuchungen an embryonalen Zellen, die während der fortschreitenden Differenzierung den umgekehrten Vorgang, eine Zunahme der K-Leitfähigkeit, erkennen lassen (Sperelakis, 1979).

Diese Reduzierung der K-Leitfähigkeit unter Kulturbedingungen ist dabei offensichtlich nicht mit einer Abnahme der K-Kanaldichte verbunden, sondern beruht möglicherweise auf einer Inaktivierung vorhandener K-Kanäle. Wenn die Zellen mit der Pipettenlösung dialysiert werden, erfolgt eine Aufhebung dieser Inaktivierung und als Folge wird ein Auswärtsstrom mit hoher Selektivität für K-Ionen induziert. Bei voller Induzierung dieses K-Stroms konnten Ruhepotentiale von mehr als -100 mV gemessen werden; dies entspricht einem P_{Na}/P_K-Verhältnis von $< 0{,}01$. Auch aufgrund der einwärtsgleichrichtenden Charakteristik und der spannungsabhängigen Blockierung durch extrazellu-

läre Ba-Ionen kann dieser Strom als K-Strom identifiziert werden.

Die Lage des maximalen Auswärtsstroms und der Bereich negativen Widerstands dieses induzierten K-Stroms sind im Vergleich zu steady-state Stromspannungsbeziehungen am Purkinjefaden zu positiveren Spannungen verschoben (vgl. Carmeliet, 1982). Dies läßt auf die Beteiligung unterschiedlicher Stromsysteme schliessen. Nach Lage und Verlauf kann die hier beschriebene Stromspannungsbeziehung bei voller Induzierung des K-Stroms am ehesten mit der des ACh-induzierten K-Stroms (Noma & Trautwein, 1978; Noma et al., 1979b) und mit der vollaktivierten Stromspannungsbeziehung des verzögerten Einwärtsgleichrichters (u.a. Noble & Tsien, 1969) verglichen werden.

Mit dem verzögerten Einwärtsgleichrichter ergibt sich noch eine andere Übereinstimmung. Während der Zunahme des K-Auswärtsstroms (Abb. 12, Kurve B oben; unten) zeigt der K-Strom eine Spannungs- und Zeitabhängigkeit, die sowohl unter Kontrollbedingungen als auch bei voller Induzierung des K-Stroms nicht beobachtet wird. Bei Spannungssprüngen weist dieser Strom das charakteristische Verhalten des verzögerten Einwärtsgleichrichters auf, wie es an verschiedenen Herzpräparaten beschrieben wurde (Noble & Tsien, 1969; Noma & Irisawa, 1976; McDonald & Trautwein, 1978; DiFrancesco et al., 1979; Yanagihara et al., 1980). Bei Depolarisation aktiviert der K-Strom mit einer Zeitkonstanten von mehreren 100 ms (Abb. 12), und bei Repolarisation wird er wieder entsprechend inaktiviert. Diese spannungsabhängige Inaktivierung scheint im Verlauf der weiteren Ableitung aufgehoben zu werden. Als Folge nimmt auch bei negativen Spannungen der K-Auswärtsstrom zu, so daß bei voller Induzierung sich schließlich die oben beschriebene Stromspannungsbeziehung ausbildet.

Die spezifischen Veränderungen des K-Stroms während der Ableitung lassen vermuten, daß dieser Strom einer komplexen intrazellulären Kontrolle unterliegt, die aufgrund der Dialyse der Zelle mit der Pipettenlösung gestört wird. Mögliche Ursachen für den Anstieg der K-Leitfähigkeit könnten eine geänderte intrazelluläre Ca-Konzentration oder die Abnahme der ATP-Kon-

zentration sein. So ist seit langem bekannt, daß die Hemmung des Energiestoffwechsels mit einem Anstieg der K-Leitfähigkeit verbunden ist (Trautwein et al., 1954; Vleugels et al., 1980). Da bei Hemmung des Energiestoffwechsels eine Abnahme sowohl der ATP-Konzentration als auch ein Anstieg der Ca-Konzentration erfolgen sollten, erlaubten die Versuche keine eindeutige Unterscheidung zwischen beiden möglichen Ursachen. Auch die direkte Veränderung der intrazellulären Ca-Konzentration durch die Injektion verschiedener Testlösungen konnte keinen endgültigen Beweis einer Beteiligung von Ca-Ionen erbringen, da die Auswirkung auf die ATP-Konzentration nicht bestimmt wurde (Isenberg, 1977 a-d).

Auch an isolierten Ventrikelzellen konnte kürzlich unter dem Einfluß eines Stoffwechselhemmers (DNP, 2,4-Dinitrophenol) die Zunahme der K-Leitfähigkeit nachgewiesen werden (Isenberg et al., 1983). Aufgrund der hohen Amplitude der induzierten K-Ströme gelang es den Autoren jedoch nicht, die gesamte Stromspannungsbeziehung dieses Stroms aufzunehmen, so daß der Vergleich mit den hier beschriebenen Strömen nur begrenzt möglich ist. Die von den Autoren dargestellten Befunde legen jedoch die Vermutung nahe, daß der unter der Wirkung von DNP induzierte Strom mit dem hier beschriebenen K-Strom identisch ist und seine Induzierung auf einem ähnlichen Mechanismus beruht.

Die Eindeutigkeit der von Isenberg et al. (1983) durchgeführten Unterscheidung verschiedener Komponenten dieses K-Stroms mit Hilfe der blockierenden Wirkung von Cs- und Ba-Ionen muß bezweifelt werden. Beide Ionen führen bekanntermaßen (vgl. Ba-Block in der vorliegenden Untersuchung) bei K-Kanälen zu einem spannungsabhängigen Block unterschiedlicher Affinität. Der selbst in Gegenwart von hohen Konzentrationen des Blockers verbliebene K-Strom sollte einen der Spannungsabhängigkeit des Blocks entsprechenden Verlauf aufweisen und damit keineswegs allein die verbliebenen Komponenten anderer K-Ströme repräsentieren, wie diese Autoren vermuten.

Aufgrund der hier beschriebenen Stromspannungsbeziehungen unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von Ba-Ionen, muß

vielmehr angenommen werden, daß es unter den genannten Bedingungen zur Induzierung eines einzigen einwärtsgleichrichtenden K-Stroms kommt. Auch in der OSOP-Ableitung, die mit der Ganzzellableitung aufgrund nahezu identischer Versuchsbedingungen direkt vergleichbar ist, konnte gut reproduzierbar nur ein Typ von Kanalaktivität identifiziert werden.

Isenberg et al. (1983) führen den Anstieg der K-Leitfähigkeit auf eine Zunahme der intrazellulären Ca-Konzentration (Ca_i) als Folge des ATP-Mangels zurück. In der vorliegenden Untersuchung konnte hingegen nachgewiesen werden, daß weder die Aktivität des induzierten K-Kanals noch der K-Strom an der gesamten Zelle durch Veränderung der Ca_i beeinflußt werden. Die verzögerte Induzierung des K-Stroms bei niedrigem Ca_i ($<10^{-7}$ M) könnte auf einen verminderten ATP-Verbrauch der Zellen unter diesen Bedingungen schließen lassen und damit den ATP-Mangel als eigentliche Ursache des beobachteten Anstiegs der K-Leitfähigkeit ausweisen. Diese Vermutung wird durch den kürzlich erbrachten Nachweis eines durch ATP blockierbaren K-Kanals an isolierten Ventrikelzellen unterstützt (Trube & Hescheler, 1983). Die oftmals geäußerte Hypothese einer direkten Regulierung der K-Leitfähigkeit durch Ca-Ionen, wie sie für andere elektrisch erregbare Zellen nachgewiesen wurde, muß daher am Herzen eventuell zugunsten eines durch ATP vermittelten Kontrollmechanismus korrigiert werden.

K-Kanäle in der CAP-Ableitung

Bisher sind nur wenige, kurze Mitteilungen über Einzelkanaluntersuchungen an K-Kanälen des Herzens erschienen (Trube et al., 1981; Momose et al., 1983; Sakmann et al., 1983; Trube & Hescheler, 1983). Die Diskussion muß sich daher im wesentlichen auf Spannungsklemmuntersuchungen sowie auf einen Vergleich mit K-Kanälen anderer Präparate stützen.

Es ist seit langem bekannt, daß ACh durch Bindung an den muskarinergen Rezeptor am Herzen eine Zunahme der K-Leitfähig-

keit induziert (Harris & Hutter, 1956; Trautwein & Dudel, 1958). Die Vorgänge, die von der Bindung dieses Transmitters an den Rezeptor schließlich zur Öffnung eines K-selektiven Kationenkanals führen, werden zur Zeit noch kontrovers diskutiert. Während Trautwein und Mitarbeiter (Noma & Trautwein, 1978; Noma et al., 1979 a, b; Osterrieder et al., 1980) aufgrund von Relaxationsmessungen und Rauschanalysen des ACh-induzierten Stroms die Aktivierung eines speziellen K-Kanals favorisieren, nehmen Garnier et al. (1978) und Ojeda et al. (1981) an, daß über den muskarinergen Rezeptor eine dauernd vorhandene Ruheleitfähigkeit für K-Ionen (g_{K1}) moduliert wird. Obwohl Sakmann et al. (1983) kürzlich erste Einzelkanalmessungen eines ACh-aktivierten K-Kanals in isolierten Zellen des AV-Knotens publiziert haben, die weitgehend mit den Befunden der vorliegenden Arbeit übereinstimmen, ist eine endgültige Entscheidung über die Richtigkeit einer der beiden Hypothesen noch nicht möglich.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse muß daher die Frage im Vordergrund stehen, ob der unter Kontrollbedingungen sichtbare K-Kanal (Ruhe-K-Kanal) mit dem in Gegenwart von ACh aktivierten Kanal identisch ist. Die dargestellten Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß beide Typen von Kanalereignissen auf einen einzigen K-Kanal zurückzuführen sind, dessen Ruheaktivität durch ACh erhöht wird. Folgende Befunde unterstützen diese Vermutung:

1. Die Kanalereignisse unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von ACh können aufgrund ihrer Amplituden und ihrer mittleren Offenzeiten auch bei Ableitung von demselben Membranpatch nicht voneinander unterschieden werden.
2. Die Erhöhung der Aktivität nach einer Freisetzung von ACh in der Pipette erfolgt in Abhängigkeit von der vorhandenen Ruheaktivität.
3. Die Ruheaktivität beruht nicht auf einer durch ACh "verunreinigten" Pipettenlösung, da sie auch in Gegenwart hoher Atropinkonzentrationen (von 10^{-5} M) nicht unter-

drückt wird. Im Gegensatz hierzu blockiert Atropin (10^{-5} M) die ACh-bedingte Erhöhung der Kanalaktivität vollständig.

Wenn die oben genannte Vermutung richtig ist, so könnte das beobachtete Burstverhalten des Kanals, im Unterschied zum von Sakmann et al. (1983) vorgeschlagenen Modell, das das Burstverhalten - ähnlich wie beim nikotinergen ACh-Kanal - als Folge von Mehrfachöffnungen während der Bindung des Agonisten an den Rezeptor beschreibt, eher durch ein Blockierungsmodell erklärt werden (vgl. Methfessel & Boheim, 1982). Ein solches Modell sieht die Bindung des Agonisten, genau wie im Fall des Ba-Blocks, nur im offenen Zustand des Kanals vor. Bei Bindung des Agonisten an den Rezeptor wird der Übergang in den geschlossenen Zustand verzögert oder verhindert, so daß die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals ansteigt. Die Vorzüge dieses Modells liegen in einer einfachen Erklärung des verzögerten, frühen Zeitverlaufs der ACh-bedingten Antwort (Pott & Pusch, 1979; Pott, 1979; Osterrieder et al., 1980). Die Kinetik des Anstiegs könnte danach von folgenden drei Parametern (Geschwindigkeitskonstanten der entsprechenden Prozesse) bestimmt sein:
1. der Diffusion von ACh vom Freisetzungsort zu den Rezeptoren,
2. der mittleren Geschlossenzeit der Kanäle in Ruhe (eine erste grobe Abschätzung führt zu Zeitkonstanten von ca. 50-100 ms bei der gegebenen Temperatur) und 3. der Bindungsreaktion an den Rezeptor. Die beteiligten Prozesse wären auch für die beobachtete hohe Temperaturabhängigkeit des frühen Antwortverlaufs verantwortlich. Die Bestätigung einer solchen Hypothese bedarf jedoch einer ausführlichen Analyse von Einzelkanalableitungen. In den bisher dazu durchgeführten Experimenten mit ACh-haltigen Lösungen zeigte sich jedoch immer eine große Anzahl von ACh-aktivierten Kanälen, was auf eine sehr hohe Dichte dieses Kanals hindeutet.

Eine Umkehrung des Stroms durch die ACh-aktivierten bzw. Ruhe-Kanäle in Auswärtsrichtung, wie sie von Sakmann et al. (1983) gefunden wurde, konnte in den dargestellten Experimenten nicht beobachtet werden. Die Ursache hierfür liegt möglicher-

weise in der hier ausschließlich verwendeten Pipettenlösung mit einer K-Konzentration von 140 mM.

Der in wenigen Ableitungen sichtbare längere K-Kanal könnte mit dem von Trube et al. (1981) beschriebenen Einwärtsgleichrichter von Ventrikelzellen identisch sein. Inwieweit dieser Kanal mit dem in der OSOP-Ableitung registrierten K-Kanal identisch ist, kann aufgrund der geringen Zahl der Beobachtungen und der Verschiedenheit der Versuchsbedingungen zur Zeit nicht beantwortet werden.

Der einwärtsgleichrichtende K-Kanal

Für die meisten Einzelkanalableitungen wurde der isolierte "outside-out Membranpatch" gewählt. Diese Ableitkonfiguration erlaubt die sichere Kontrolle der Klemmspannung und der ionalen Zusammensetzung der Lösungen auf beiden Membranseiten sowie einen direkten Vergleich mit den unter WCR-Bedingungen gewonnenen Ergebnissen. Als besonders vorteilhaft erwies sich, daß der untersuchte Kanal unter diesen Bedingungen reproduzierbar und ohne Überlagerung durch andere Kanäle registriert werden konnte.

Im Gegensatz zu anderen Kanälen, wie zum Beispiel dem spannungsabhängigen Na-Kanal (Sigworth & Neher, 1980), dem nikotinergen ACh-Kanal (Horn & Patlak, 1980) oder dem Ca-aktivierten K-Kanal (z.B. Methfessel & Boheim, 1982), nimmt die Aktivität des untersuchten Kanals während der Ableitung kontinuierlich ab. Eine ähnliche Aktivitätsabnahme haben verschiedene Autoren für Ca-Kanäle in dialysierten Zellen (Kostyuk, 1981; Byerly & Hagiwara, 1982) und an isolierten Membranstücken (Fenwick et al., 1982) berichtet. Dieser Vorgang beruht vermutlich auf dem Verlust von cytoplasmatischen Faktoren, die an der Kontrolle der Kanalaktivität beteiligt sind.

Einzelne K-Kanäle sind bisher an verschiedenen Präparaten mit der Patch-clamp-Technik untersucht worden (Übersicht: Latorre & Miller, 1983). Die meisten Publikationen beziehen sich auf den sogenannten Ca-aktivierten K-Kanal, der aufgrund seiner zehnmal höheren Leitfähigkeit und der geringeren Selektivität

von dem hier beschriebenen Kanal deutlich zu unterscheiden ist.

Ein direkter Vergleich scheint eher mit einwärtsgleichrichtenden Kanälen möglich, wie sie an kultivierten Skelettmuskelzellen der Ratte (Ohmori et al., 1981: 10-45 pS), Tunikateneiern (Fukushima, 1982: 5-12 pS) und an isolierten Ventrikelzellen (Trube et al., 1981: 27 pS; Trube & Hescheler, 1983: 28 pS und 80 pS) vorkommen. Obwohl die Angaben über die Leitfähigkeiten in Abhängigkeit von den jeweiligen Versuchsbedingungen unterschiedlich sind, liegen die Werte in einer vergleichbaren Größenordnung mit den hier beschriebenen Werten. Die beste Übereinstimmung ergibt sich mit dem von Sakmann et al. (1983) angegebenen Wert von 39 pS bei 70 mM K_o für Einwärtsströme, wenn man die Abhängigkeit von der extrazellulären K-Konzentration berücksichtigt (zum Vergleich 33 pS bei 20 mM K_o in der vorliegenden Untersuchung).

Der Hauptunterschied der vorliegenden Untersuchung gegenüber anderen Publikationen liegt darin, daß der K-Kanal im physiologisch relevanten Spannungsbereich in Auswärtsrichtung gemessen wurde. Dadurch ist eine direkte Vergleichbarkeit der Einzelkanaleigenschaften mit bekannten Stromspannungsbeziehungen gewährleistet.

Der Vergleich zwischen der WCR- und der OSOP-Ableitung läßt die Vermutung zu, daß der untersuchte Kanal an der beobachteten Induzierung des K-Auswärtsstroms direkt beteiligt ist. Die in der OSOP-Ableitung registrierte Kanalaktivität repräsentiert daher nicht die Ruheaktivität des Kanals unter physiologischen Bedingungen, sondern sie wird durch die vorgegebene Pipettenlösung an der Innenseite der Membran induziert. Der untersuchte Kanal sollte folglich - zumindest im beobachteten Aktivitätszustand - mit dem Ruhe-K-Kanal (I_{K1}) nicht identisch sein.

Der Kanal zeigt im Unterschied zu anderen Untersuchungen (Trube et al., 1981; Momose et al., 1983; Sakmann et al., 1983) in Ein- und Auswärtsrichtung für den Einzelkanalstrom die gleiche lineare Stromspannungsbeziehung mit einheitlicher Einzelkanalleitfähigkeit. Die Einwärtsgleichrichtung der rekonstruierten, steady-state Stromspannungsbeziehung ist im kinetischen

Verhalten, nämlich in der Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit, begründet.

Damit kann die Einwärtsgleichrichtung des untersuchten K-Stroms im Gegensatz zu früher vorgeschlagenen Modellen (vgl. z.B. Ciani et al., 1978) auf einfache Weise erklärt werden. Einwärtsgleichrichtung kommt dabei nicht durch die Abhängigkeit der K-Leitfähigkeit von der treibenden Kraft ($V-E_K$) zustande, wie für andere K-Ströme angenommen wurde (Hodgkin & Horowicz, 1959; Hagiwara & Takahashi, 1974), sondern wird bei konstanten K_o (untersucht wurden 2 und 5 mM) ausschließlich durch das spannungsabhängige Öffnen und Schließen des Kanals ("Gating") hervorgerufen. Die Einzelkanalleitfähigkeit hingegen scheint weitgehend spannungsunabhängig zu sein, variiert aber mit der Höhe der extrazellulären K-Konzentration.

Nimmt man beide Befunde zusammen, so kann sich unter bestimmten Versuchsbedingungen bei hohen K_o eine scheinbare Abhängigkeit der K-Leitfähigkeit von der treibenden Kraft ergeben, die jedoch offensichtlich nicht für die beobachtete Einwärtsgleichrichtung verantwortlich ist. Zu einer ähnlichen Auffassung kommen auch Leech & Stanfield (1981), die die Einwärtsgleichrichtung an Skelettmuskelfasern bei Veränderung der extra- und intrazellulären K-Konzentrationen untersucht haben. Inwieweit eine solche Erklärung auch für Phänomene der Einwärtsgleichrichtung an anderen K-Kanälen zutrifft, muß genau geprüft werden.

Die Abhängigkeit der Einzelkanalleitfähigkeit von der extrazellulären K-Konzentration ist auch unter einem anderen Aspekt von Interesse; sie bestätigt die Vorstellung, daß K-Kanäle als "multi-ion single-file" Poren angesehen werden können (vgl. Hille & Schwarz, 1978). Die Bezeichnung soll zum Ausdruck bringen, daß der Kanal im wesentlichen aus einer wässerigen Pore besteht, durch die die Ionen in perlschnurartiger Reihenfolge einzeln hintereinander durchtreten, wobei der Kanal zu jedem Zeitpunkt von mindestens zwei oder mehr Ionen besetzt wird. Zur Sicherstellung eines selektiven Ionendurchtritts weist die Kanalröhre verschiedene Bindungsstellen auf, die zu

verschiedenen Ionen eine unterschiedliche Affinität besitzen. Die verschiedenen Ionenspezies können dabei aufgrund ihrer Ladung, ihres Ionenradius und ihrer Hydratation unterschieden werden. Permeierende Ionen besitzen eine für den Durchtritt günstige Kombination der verschiedenen Parameter und können, indem sie nacheinander die Bindungsstellen besetzen, den Kanal entsprechend der treibenden Kraft passieren.

Andere Ionen passen wegen ihrer Größe nicht in ein solches Selektivitätsfilter oder binden so stark an einzelne Bindungsstellen, daß der Übergang zur folgenden nicht vollzogen werden kann. Letztere stellen die hochaffinen Blocker dar, wie z.B. Ba-Ionen, die zwar etwa denselben Ionenradius wie K-Ionen, aber die zweifache Ladung besitzen.

Nach einer solchen Vorstellung vom Aufbau eines K-Kanals läßt sich die Abhängigkeit der Einzelkanalleitfähigkeit von der extrazellulären K-Konzentration wie folgt erklären. Eine für den Ionenstrom wichtige Bindungsstelle ist von der extrazellulären Seite der Membran zugänglich und kann außer von K^+ auch von anderen, blockierenden Ionen, wie Na^+ oder Ba^{++} besetzt werden. Bei der Bindung eines blockierenden Ions wird der Ionenstrom je nach der Affinität zu Bindungsstelle für kurze Zeit blockiert. Für Na-Ionen sollten diese Blockierungen, falls sie überhaupt stattfinden, sehr kurz sein; sie können nicht mehr einzeln aufgelöst werden, der offene Zustand zeigt lediglich ein höheres Stromrauschen und eine geringere mittlere Amplitude. Hochaffine Blocker jedoch binden ausreichend lange an den Kanal, die Blockierungszeit kann wie im Fall der Ba-Ionen deutlich beobachtet werden. Eine Erhöhung der extrazellulären K-Konzentration bewirkt eine Abnahme der Besetzungswahrscheinlichkeit für blockierende Ionen; so kann, wie andere Autoren gezeigt haben, die blockierende Wirkung dieser Ionen teilweise aufgehoben werden (vgl. Hagiwara et al., 1978; Standen & Stanfield, 1978; Fukushima, 1982).

Das aufgrund der kinetischen Analyse des Ba-Blocks vorgeschlagene Modell stimmt mit einer solchen Vorstellung vom Aufbau eines K-Kanals überein. Ba-Ionen können offensichtlich an

eine Bindungsstelle im Kanal gelangen, diese besetzen und so den Ionenstrom blockieren. Die Spannungsabhängigkeit der Blockierungszeiten verdeutlicht dabei, daß Ba-Ionen den Kanal nicht passieren können, sondern die Bindungsstelle in Richtung zur Membranaußenseite wieder verlassen. Die Eindringtiefe des Ba-Ions in den Kanal von ca. 25% der elektrischen Distanz steht mit Untersuchungen am verzögerten Einwärtsgleichrichter des Squidaxons im Einklang, die zeigen, daß bei einem Ba-Block von innen die Eindringtiefe ca. 50 - 70% beträgt (Armstrong & Taylor, 1980; Eaton & Brodwick, 1980). Wenn die Ba-Bindungsstelle in der Nähe des Selektivitätsfilters liegt oder mit ihm identisch ist, so muß das Selektivitätsfilter von außen betrachtet auf ca. 1/4 der Membrandicke lokalisiert sein (vgl. Latorre & Miller, 1983).

Aus der kinetischen Analyse des Ba-Blocks ergibt sich weiter, daß ein Übergang vom blockierten in den geschlossenen Zustand nicht stattfinden kann; der blockierte Zustand kann ausschließlich über den offenen erreicht werden. Der Kanal kann demnach, falls Ba das Selektivitätsfilter oder eine in der Nähe gelegene Bindungsstelle besetzt hält, nicht schließen, d.h., der postulierte "Gating"-Mechanismus muß in einer direkten Wechselwirkung mit dieser Bindungsstelle stehen. Die Selektivitäts- und "Gating"-Eigenschaften des Kanals müssen folglich zumindest in unmittelbarer Nähe zueinander, wenn nicht in derselben Kanalstruktur lokalisiert sein. Dies widerspricht einem vom Filter unabhängigen, räumlich getrennten "Gating"-Mechanismus des verzögerten Einwärtsgleichrichters, wie aus Blockierungsversuchen mit TEA (Tetraäthylammonium) abgeleitet wird (Armstrong, 1975). Der Widerspruch ließe sich auflösen, indem man die Existenz von zwei unabhängigen "Gating-Vorgängen" annimmt, wovon der eine für die Eigenschaft der verzögerten Aktivierung und der andere für das Zustandekommen der Einwärtsgleichrichtung verantwortlich ist.

Zusammenfassend lassen sich folgende Charakteristika des Kanals ableiten:

- Aufgrund seiner Leitfähigkeit, Selektivität und Blockier-

barkeit weist der Kanal Ähnlichkeiten mit dem verzögerten Einwärtsgleichrichter verschiedener Präparate auf.

- Die Lokalisation der Ba-Bindungsstelle steht im Einklang mit Blockierungsversuchen am verzögerten Einwärtsgleichrichter des Squidaxons.
- Die hohe Selektivität, der Ba-Block und die K_o-Abhängigkeit der Einzelkanalleitfähigkeit unterstützen die Annahme, daß K-Kanäle "multi-ion single-file" Poren sind.
- Die makroskopisch sichtbare Einwärtsgleichrichtung ist keine Eigenschaft der Leitfähigkeit, sondern eine Folge des spannungsabhängigen "Gating".
- Selektivitätsfilter und dieser "Gating"-Mechanismus stehen in enger Wechselwirkung und sind möglicherweise identisch, d.h., die negativ geladene Ba-Bindungsstelle könnte direkt am Öffnen und Schließen des Kanals beteiligt sein.

Die Frage, welches bekannte Stromsystem am Herzen durch diesen Kanal repräsentiert wird, kann zur Zeit nicht mit Sicherheit beantwortet werden, da es bei herkömmlichen Spannungsklemmuntersuchungen keine Bedingung gibt, die die isolierte Betrachtung eines einzigen K-Stroms erlaubt. Eine Unterscheidung der verschiedenen K-Ströme ist daher oftmals per Definition vorgenommen worden. So ist der Hintergrund-K-Strom (I_{K1}) laut Definition zeitunabhängig; eine solche Zeitunabhängigkeit läßt sich aber nicht mit der Vorstellung eines spannungsabhängig geschalteten Kanals, wie es für die meisten bisher untersuchten Kanäle zutrifft, vereinbaren. Der durch den hier beschriebenen Kanal fließende Strom würde bei einer solchen Unterscheidung eine zeitabhängige und eine zeitunabhängige Komponente aufweisen. Die zeitunabhängige Komponente entspricht dabei dem Strom, der in der steady-state Stromspannungsbeziehung aufgetragen ist, und die zeitabhängige dem Relaxationsstrom, der bei Spannungssprüngen durch die Änderung der Offenwahrscheinlichkeit hervorgerufen wird.

Bei einem Vergleich von Einzelkanaluntersuchungen mit herkömmlichen Spannungsklemmexperimenten muß zudem berücksichtigt werden, daß die Patch-clamp-Technik selbst die Eigen-

schaften des untersuchten Kanals verändern kann, so daß ein direkter Vergleich erschwert wird. Durch die Isolierung eines kleinen Membranbereichs, der bei der OSOP-Ableitung völlig von der Zelle getrennt ist, und der Verwendung von relativ einfachen intrazellulären Lösungen werden Versuchsbedingungen geschaffen, die sich grundsätzlich von denen herkömmlicher, elektrophysiologischer Untersuchungen unterscheiden.

Trotz der Einschränkungen bestehen bemerkenswerte Übereinstimmungen zwischen den hier beschriebenen Einzelkanaleigenschaften und makroskopischen Stromuntersuchungen:

1. Der untersuchte Kanal weist eine Reihe von Gemeinsamkeiten mit dem bei Dialyse der Zellen induzierten K-Strom auf, so daß eine direkte Beteiligung dieses Kanals vermutet werden muß. Die Erhöhung der K-Leitfähigkeit bei Hemmung des Energiestoffwechsels könnte, da sie vergleichbare Merkmale besitzt (vgl. Isenberg et al., 1983), auf der Aktivierung des hier beschriebenen K-Kanals beruhen.
2. Der Verlauf der rekonstruierten Stromspannungsbeziehung erinnert an die vollaktivierte Stromspannungsbeziehung des verzögerten Einwärtsgleichrichters, wie sie an verschiedenen Herzpräparaten bestimmt wurde (vgl. Noble & Tsien, 1969; McDonald & Trautwein, 1978; DiFrancesco et al., 1979; Yanagihara et al., 1980).
3. Auch die steady-state Stromspannungskurve des ACh-induzierten K-Stroms besitzt einen ähnlichen Verlauf mit einem Maximum bei ca. -20 mV (Noma & Trautwein, 1978; Noma et al., 1979 b).

Die Übereinstimmung der aufgrund der Einzelkanaluntersuchungen rekonstruierten Stromspannungsbeziehung mit scheinbar grundsätzlich verschiedenen K-Stromsystemen wirft die Frage nach der Anzahl unterschiedlicher K-Kanäle am Herzen auf, d. h. wieviele verschiedene K-Kanaltypen müssen mindestens vorhanden sein, um die Vielfalt der K-Ströme befriedigend erklären zu können?

Die teilweise Übereinstimmung verschiedener Stromspannungskurven legt den Schluß nahe, daß es nur wenige Kanaltypen gibt, die darüber hinaus noch gemeinsame Baumerkmale aufweisen. So ist besonders das Phänomen der Einwärtsgleichrichtung ein häufig beobachtetes Merkmal verschiedener K-Ströme bzw. K-Stromkomponenten. Folgt man einer solchen Vorstellung von einem einheitlichen Bauprinzip der K-Kanäle, so könnten verschiedene Kanaltypen durch eine aus Untereinheiten zusammengesetzte Gesamtstruktur erklärt werden. Die "Grundeinheit", der Kanal mit dem Selektivitätsfilter und einem einfachen "Gating"-Mechanismus, würde je nach Funktion mit einem Rezeptor, wie z. B. dem muskarinergen ACh-Rezeptor, und (oder) mit weiteren regulatorischen Einheiten verknüpft sein. Diese regulatorischen Einheiten würden dabei einerseits eine zusätzliche Spannungs- oder Zeitabhängigkeit des Kanals hervorrufen, andrerseits könnten sie den Angriffspunkt für Veränderungen der Kanalaktivität über einen intrazellulären Regelmechanismus bilden, wie er beispielsweise bei der Phosphorylierung von Ca-Kanälen als weitgehend gesichert gilt (Reuter, 1983).

Ein solcher Kanal könnte in Abhängigkeit von den gewählten Bedingungen im Spannungsklemmexperiment kinetisch unterschiedliche K-Ströme hervorrufen, die bei Untersuchungen zur Selektivität, Leitfähigkeit und Blockierbarkeit weitgehend ähnliche Eigenschaften aufweisen. Diese Vorstellung böte eine ausreichende Erklärung für die Gemeinsamkeiten zwischen dem hier beschriebenen Kanal und verschiedenen K-Strömen am Herzen. Die dargestellte Vorstellung vom Aufbau eines K-Kanals ist zur Zeit noch weitgehend spekulativ. Eine Vielzahl vergleichender Spannungsklemmuntersuchungen und Einzelkanalanalysen wird noch erforderlich sein, um ein detailliertes Bild vom Aufbau und der Funktion der K-Kanäle in der Herzzellmembran zu entwerfen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ausdifferenzierte Herzmuskelzellen vom rechten Vorhof adulter Meerschweinchen werden voneinander dissoziiert und in Zellkultur gehalten. Die Isolierungsmethode basiert auf der kombinierten Anwendung einer Erniedrigung der extrazellulären Ca-Konzentration zur Trennung der Glanzstreifen sowie der retrograden Perfusion des Herzens mit den proteolytischen Enzymen Collagenase, Elastase und unspezifischer Protease.

Die isolierten Myozyten haben eine spindelförmige Gestalt mit einem Durchmesser von ca. 7 µm und einer Länge von 150-300 µm. Sie besitzen ein stabiles Ruhepotential von über -70 mV und sind in der Lage, normale Aktionspotentiale zu generieren. Auch andere elektrophysiologische Eigenschaften der isolierten Zellen, wie ihre Empfindlichkeit für ACh, die Wirkung von Ba-Ionen sowie die passiven elektrischen Membraneigenschaften, sind denen des Gewebepräparates vergleichbar.

In Zellkultur heften sich die Zellen an den Boden der Kulturschalen an und verkürzen sich während der ersten drei Tage zunehmend, bis sie schließlich eine nahezu kugelförmige Gestalt mit einem Durchmesser von ca. 15-30 µm aufweisen. Diese "Cardioballs" eignen sich in besonderem Maß für Experimente mit der verbesserten Patch-clamp-Technik.

Nach weiteren 5-7 Tagen flachen sich die Zellen ab und ähneln in ihrer Gestalt embryonalen Herzmuskelzellen in Kultur. In diesem Stadium können die Vorhofzellen über Monate in Kultur gehalten werden.

Die "Cardioballs" besitzen einen hohen Eingangswiderstand (>1 GΩ) und ein im Vergleich zu den frisch isolierten Zellen reduziertes Ruhepotential (von ca. -40 bis -50 mV); sie zeigen häufig Spontanaktivität.

Bei Dialyse dieser Zellen mit der Pipettenlösung (140 mM KCl; 10 mM HEPES-NaOH pH 7,2; nominell Ca-frei) wird die Induzierung eines Auswärtsstroms mit einer hohen Selektivität für K-Ionen (Umkehrpotential bei 2 mM K_o >-100 mV) beobachtet. Die steady-

state Stromspannungsbeziehung dieses K-Stroms weist Einwärtsgleichrichtung mit einem maximalen Strom bei -20 mV und einem Bereich negativen Widerstands bei positiveren Spannungen auf.

Der durch die Ableitbedingungen induzierte K-Strom kann in zeit- und spannungsabhängiger Weise durch extrazelluläre Ba-Ionen (0,2 mM) blockiert werden. Die Induzierung der K-Leitfähigkeitserhöhung wird durch Veränderungen der intrazellulären Ca-Konzentration nicht beeinflußt.

In den Ableitkonfigurationen des CAP ("cell attached patch") und OSOP ("outside-out patch") treten Stromfluktuationen auf, die auf das Öffnen und Schließen von K-Kanälen zurückgeführt werden.

In der CAP-Ableitung wird regelmäßig ein kurzlebiger K-Kanal (τ_o <5 ms, Leitfähigkeit ca. 50 pS) und in wenigen Fällen ein wesentlich längerlebiger K-Kanal (τ_o von mehreren 100 ms, Leitfähigkeit ca. 40 pS) beobachtet. Bei Zugabe von ACh (von 10^{-7} - 10^{-5} M) während der Ableitung (durch Freisetzung in der Patchpipette mittels einer zu diesem Zweck konstruierten Vorrichtung) steigt die K-Kanalaktivität drastisch an. Der durch ACh über den muskarinergen Rezeptor aktivierte K-Kanal ist in bezug auf Leitfähigkeit, Selektivität und Offenzeiten nicht von dem kurzlebigen Ruhe-K-Kanal zu unterscheiden und möglicherweise mit ihm identisch.

In der OSOP-Ableitung wird reproduzierbar ein Typ von Kationenkanal mit einer hohen Selektivität für K-Ionen (P_{Na}/P_K = 0,005 bis 0,016) gefunden. Die Stromspannungskurve des Einzelkanalstroms ist weitgehend linear und hängt in ihrer Steigung von der extrazellulären K-Konzentration ab (bei 2 mM K_o 20 pS und bei 20 mM K_o 33 pS). Die Offenzeitkonstanten (bei 0 mV ca. 200 ms) und die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals hingegen sind spannungsabhängig. Die Offenwahrscheinlichkeit nimmt von ca. 0,9 bei -40 mV auf ca. 0,1 bei +40 mV ab.

Aus der Offenwahrscheinlichkeit und dem Einzelkanalstrom läßt sich eine "makroskopische" steady-state Stromspannungsbeziehung für diesen Kanaltyp rekonstruieren. Sie weist für den untersuchten Kanal eine deutliche Einwärtsgleichrichtung auf und ist mit der Stromspannungsbeziehung des an der gesamten Zelle

induzierten K-Stroms vergleichbar. Einwärtsgleichrichtung kann daher in diesem Fall auf das spannungsabhängige Öffnen und Schließen des K-Kanals zurückgeführt werden.

Der Einzelkanalstrom wird durch extrazelluläre Ba-Ionen (0,2 mM) blockiert, indem die Offenereignisse durch frequente, kurze Schließungen unterbrochen werden. Die makroskopisch sichtbare Reduzierung des K-Stroms kommt bei gleichbleibendem Einzelkanalstrom durch eine spannungsabhängige Reduzierung der Offenwahrscheinlichkeit zustande. Da der untersuchte Kanal auch in bezug auf die Blockierbarkeit durch Ba-Ionen mit dem in der Ganzzellableitung beobachteten K-Strom Gemeinsamkeiten aufweist, kann die Induzierung des K-Stroms auf die Aktivierung dieses K-Kanals zurückgeführt werden.

Die Wirkung von Ba-Ionen auf die Einzelkanalereignisse kann durch ein sequentielles Blockierungsmodell beschrieben werden. Dabei wird angenommen, daß Ba-Ionen eine Bindungsstelle im Kanal besetzen können und ihn so blockieren. Ba-Ionen können die Bindungsstelle dabei nur im offenen Zustand des Kanals erreichen oder verlassen. Aus der Spannungsabhängigkeit der Blockierung kann weiter geschlossen werden, daß diese Ba-Bindungsstelle im elektrischen Feld der Membran liegt (von außen gesehen bei ca. 25 % der "elektrischen Distanz").

Die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit allgemeinen Vorstellungen zum Aufbau und der Funktion von K-Kanälen in der Herzzellmembran diskutiert.

VI. LISTE DER ABKÜRZUNGEN

ACh - Acetylcholin

ATP - Adenosintriphosphat

AV-Knoten - Atrioventrikularknoten

Ba^{++} - Barium-Ionen

BNC-Stecker - genormte, elektrische Steckverbindung

Ca_i; Ca_o - intra- bzw. extrazelluläre Kalzium-Ionenkonzentration

CAP - "cell attached patch"; Ableitkonfiguration der Patch-clamp-Technik

EGTA - Äthylenglykol-bis(2-amino-äthyläther)N,N'-tetraessigsäure

E_K; E_{Na} usw. - nach der Nernst'schen Gleichung berechnete Gleichgewichtspotentiale der verschiedenen Ionen

E_{rev} - Umkehrpotential eines Ionenstroms

f - Digitalisierungsfrequenz

F - Faraday-Konstante

HEPES - N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure

I_K; I_{Na}; I_{si} usw. - verschiedene Ionenströme (vgl. Einleitung)

I_{unit} - Einzelkanalstrom

K - Gleichgewichtskonstante

K_D - Dissoziationskonstante

K_i; K_o - intra- bzw. extrazelluläre Kalium-Ionenkonzentration

k_o; k_{o1}; k_g; k_b - Geschwindigkeitskonstanten

Na_i; Na_o - intra- bzw. extrazelluläre Natrium-Ionenkonzentration

OSOP - "outside-out patch"; Ableitkonfiguration der Patch-clamp-Technik

P_K; P_{Na} - Permeabilitäten der Membran für K- und Na-Ionen

P_o - Offenwahrscheinlichkeit

R - Gaskonstante

R_p - Ruhepotential

T - absolute Temperatur

τ_o; τ_b; usw. - exponentielle Zeitkonstanten

V - Membranpotential

WCR - "whole cell recording"; Ableitkonfiguration der Patch-clamp-Technik

Die verwendeten Einheiten:

Länge - Meter (m, cm, µm)

Fläche - Quadratmeter (m^2, cm^2, μm^2)

Volumen - Liter (l, ml, µl)

Zeit - Sekunde (s, ms, µs) und Minute (min)

Temperatur - Grad Celsius (^{o} C)

Masse - Gramm (g, mg)

Stoffmenge - Mol (mol, mmol, µmol)

Konzentration - molar (M, mM, µM) und Mol bzw. Gramm pro Liter

elektrische Stromstärke - Ampère (A, nA, pA)

elektrische Spannung - Volt (V, mV)

elektrischer Widerstand - Ohm (Ω, MΩ GΩ)

elektrische Leitfähigkeit - Siemens (S, pS)

Kapazität - Farad (F, µF, nF, pF)

VII LITERATURVERZEICHNIS

Adam G, Läuger P, Stark G (1977) Physikalische Chemie und Biophysik.
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York

Adrian RH, Freygang WH (1962a) The potassium and chloride conductance of frog muscle membrane.
J Physiol 163: 61-103

Adrian RH, Freygang WH (1962b) Potassium conductance of frog muscle membrane under controlled voltage.
J Physiol 163: 104-114

Almers W (1972) Potassium conductance changes in skeletal muscle and the potassium concentration in the transverse tubules.
J Physiol 225: 33-56

Altschuld R, Gibb L, Ansel A, Hohl C, Kruger FA, Brierley GP (1980) Calcium tolerance of isolated rat heart cells.
J Mol Cell Cardiol 12: 1383-1395

Antoni H, Oberdisse E (1965) Elektrophysiologische Untersuchungen über die Barium-induzierte Schrittmacher-Aktivität im isolierten Säugetiermyokard.
Pflügers Arch 284: 259-272

Armstrong CM (1975) Ionic pores, gates and gating currents.
Q Rev Biophys 7: 179-210

Armstrong CM, Taylor S (1980) Interaction of barium ions with potassium channels in squid axons.
Biophys J 30: 473-488

Barrett JN, Magleby KL, Pallotta BS (1982) Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle.
J Physiol 331: 211-230

Baumgarten CM, Isenberg G (1977) Depletion and accumulation of potassium in the extracellular clefts of cardiac Purkinje fibers during voltage clamp hyperpolarization and depolarization.
Pflügers Arch 368: 19-31

Bean RC, Shepherd WC, Chan H, Eichner J (1969) Discrete conductance fluctuations in lipid bilayer protein membranes.
J Gen Physiol 53: 741-757

Bechem M, Glitsch HG, Pott L (1981) Facilitation of acetylcholine release from cardiac parasympathetic nerve endings, effect of stimulation pattern and Mn ions.
Pflügers Arch 391: 105-111

Belardinelli L, Isenberg G (1983) Isolated atrial myocytes: adenosine and acetylcholine increase potassium conductance.
Am J Physiol 244: H734-H737

Berry MN, Friend DS, Scheuer J (1970) Morphology and metabolism of intact muscle cells isolated from adult rat heart.
Circ Res 26: 679-687

Bodewei R, Hering S, Lemke B, Rosenshtraukh LV, Undrovinas AI, Wollenberger A (1982) Characterization of the fast sodium current in isolated rat myocardial cells: simulation of the clamped membrane potential.
J Physiol 325: 301-315

Brown HF (1982) Electrophysiology of the sinoatrial node.
Physiol Rev 62: 505-530

Brown HF, Clark A, Noble SJ (1976a) Identification of the pacemaker current in frog atrium.
J Physiol 258: 521-545

Brown HF, Clark A, Noble SJ (1976b) Analysis of pacemaker and repolarization currents in frog atrial muscle.
J Physiol 258: 547-577

Brown AM, Lee KS, Powell T (1981a) Voltage clamp and internal perfusion of single rat heart muscle cells.
J Physiol 318: 455-477

Brown AM, Lee KS, Powell T (1981b) Sodium current in single rat heart muscle cells.
J Physiol 318: 479-500

Brown HF, Noble SJ (1969) Membrane currents underlying delayed rectification and pacemaker activity in frog atrial muscle.
J Physiol 204: 717-736

Byerly L, Hagiwara S (1982) Calcium currents in internally perfused nerve cell bodies of Limnea stagnalis.
J Physiol 322: 503-528

Cachelin AB, De Peyer JE, Kokubun S, Reuter H (1983) Sodium channels in cultured cardiac cells.
J Physiol 340: 389-401

Carmeliet E (1982) Induction and removal of inward-going rectification in Sheep cardiac Purkinje fibers.
J Physiol 327: 285-308

Carmeliet W, Vereecke J (1979) Electrogenesis of the action potential and automaticity.
In: Berne RM, Sperelakis N, Geiger S (eds) Handbook of Physiology. The Cardiovascular System I: The Heart
American Physiological Society, Bethesda, Maryland,
p 269-334

Cavalié A, Trautwein W (1983) Single calcium channels in heart - elementary and reconstructed mean currents. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 322: R 64

Chapman RA (1979) Excitation-contraction coupling in cardiac muscle.
Prog Biophys molec Biol 35: 1-52

Ciani S, Krasne S, Miyazaki S, Hagiwara S (1978) A model for anomalous rectification: electrochemical-potential-dependent gating of membrane channels.
J Membrane Biol 44: 103-134

Clark MG, Gannon BJ, Bodkin N, Patten GS, Berry MN (1978) An improved procedure for the high-yield preparation of intact beating heart cells from the adult rat. Biochemical and morphological study.
J Mol Cell Cardiol 10: 1101-1121

Claycomb WC, Palazzo MC (1980) Culture of the terminally differentiated adult cardiac muscle cell: A light and scanning electron microscope study.
Develop Biol 80: 466-482

Colquhoun D, Hawkes AG (1977) Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drugoperated ion channels.
Proc R Soc Lond B 199: 231-262

Colquhoun D, Hawkes AG (1981) On the stochastic properties of single ion channels.
Proc R Soc Lond B 211: 205-235

Colquhoun D, Hawkes AG (1982) On the stochastic properties of bursts of single ion channel openings and of clusters of bursts.
Phil Trans R Soc Lond B 300: 1-59

Colquhoun D, Neher E, Reuter H, Stevens CF (1981) Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells.
Nature 294: 752-754

Colquhoun D, Sakmann B (1981) Fluctuations in the microsecond time range of the current through single acetylcholine receptor ion channels.
Nature 294: 464-466

Coraboeuf E (1978) Ionic basis of electrical activity in cardiac tissues.
Am J Physiol 234: H101-H116

Deck KA, Kern R, Trautwein W (1964) Voltage clamp technique in mammalian cardiac fibres.
Pflügers Arch 280: 50-62

DeHaan RL (1967) Regulation of spontaneous activity and growth of embryonic chick heart cells in tissue culture.
Develop Biol 16: 216-249

DeMello WC (1975) Effect of intracellular injection of Calcium and Strontium on cell communication in heart.
J Physiol 250: 231-245

DiFrancesco D (1981a) A new interpretation of the pacemaker current in calf Purkinje fibres.
J Physiol 314: 359-376

DiFrancesco D (1981b) A study of the ionic nature of the pacemaker current in calf Purkinje fibres.
J Physiol 314: 377-393

DiFrancesco D, Noma A, Trautwein W (1979) Kinetics and magnitude of the time-dependent K current in the rabbit SA node: effect of external potassium,
Pflügers Arch 381: 271-279

DiFrancesco D, Ojeda C (1980) Properties of the pacemaker current i_f in the sinoatrial node of the rabbit: a comparison with the current i_{K2} in Purkinje fibres.
J Physiol 308: 331-351

Dreyer F, Peper K (1974) Iontophoretic application of acetylcholine: advantages of high resistance micropipettes in connection with an electronic current pump.
Pflügers Arch 348: 263-272

Eaton DC, Brodwick MS (1980) Effects of barium on the potassium conductance of squid axon.
J Gen Physiol 75: 727-750

Fenwick EM, Marty A, Neher E (1982) Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells.
J Physiol 331: 599-635

Fukushima Y (1982) Blocking kinetics of the anomalous potassium rectifier of tunicate egg studied by single channel recording.
J Physiol 331: 311-331

Garnier D, Nargeot J, Ojeda C, Rougier O (1978) The action of acetylcholine on background conductance in frog atrial trabeculae.
J Physiol 274: 381-396

Gerthsen C, Kneser HO, Vogel H (1974) Physik (Zwölfte Auflage).
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg New York

Glick MR, Burns AH, Reddy WJ (1974) Dispersion and isolation of beating cells from adult rat heart.
Anal Biochem 61: 32-42

Glitsch HG (1969) Über das Membranpotential des Meerschweinchenvorhofes nach Hypothermie.
Pflügers Arch 307: 29-46

Glitsch HG (1973) An effect of the electrogenic sodium pump on the membrane potential in beating guinea-pig atria.
Pflügers Arch 344: 169-180

Glitsch HG (1979) Characteristics of active Na transport in intact cardiac cells.
Am J Physiol 236: H189-H199

Glitsch HG, Pott L (1978) Effects of acetylcholine and parasympathetic nerve stimulation on membrane potential in quiescent guinea-pig atria.
J Physiol 279: 655-668

Glitsch HG, Pusch H, Venetz K (1976) Effects of Na and K ions on the active Na-transport in guinea pig auricles.
Pflügers Arch 365: 29-36

Glitsch HG, Pusch H, Schumacher T, Verdonck F (1982) An identification of the K activated Na pump current in sheep Purkinje fibres.
Pflügers Arch 394: 256-263

Gould RP, Powell T (1972) Intact isolated muscle cells from adult rat heart.
J Physiol 225: 16P-19P

Gration KAF, Lambert JJ, Ramsey RL, Rand RP, Usherwood PNR (1982) Closure of membrane channels gated by glutamate receptors may be a two-step process.
Nature 295: 599-601

Haas HG, Glitsch HG (1962) Kalium-Fluxe am Vorhof des Froschherzens.
Pflügers Arch Physiol 275: 358-375

Haas HG, Glitsch HG, Kern R, Hantsch F, Siegel G (1966) Kalium-Fluxe am Membranpotential am Froschvorhof in Abhängigkeit von der Kalium-Außenkonzentration.
Pflügers Arch 288: 43-64

Hagiwara S, Miyazaki S, Moody W, Patlak J (1978) Blocking effects of barium and hydrogen ions on the potassium current during anomalous rectification in the starfish egg.
J Physiol 279: 167-185

Hagiwara S, Takahashi K (1974) The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell.
J Membrane Biol 18: 61-80

Halle W, Wollenberger A (1968) Die Differenzierung isolierter Herzzellen in einem chemisch definierten Nährmedium.
Z Zellforsch 87: 292-314

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.
Pflügers Arch 391: 85-100

Hamill OP, Sakmann B (1981) Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells.
Nature 294: 462-464

Harris EJ, Hutter OF (1956) The action of acetylcholine on the movements of potassium ions in the sinus venosus of the heart.
J Physiol 133: 58P

Haworth RA, Hunter DR, Berkoff HA (1980) The isolation of Ca^{2+}-resistant myocytes from the adult rat.
J Mol Cell Cardiol 12: 715-723

Hille B, Schwarz W (1978) Potassium channels as multi-ion single-file pores.
J Gen Physiol 72: 409-442

Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B (1949) Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid.
Arch Sci Physiol 3: 129-150

Hodgkin AL, Huxley AF (1952a) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo.
J Physiol 116: 449-472

Hodgkin AL, Huxley AF (1952b) The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo.
J Physiol 116: 473-496

Hodgkin AL, Huxley AF (1952c) The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo.
J Physiol 116: 497-506

Hodgkin AL, Huxley AF (1952d) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.
J Physiol 117: 500-544

Hodgkin AL, Katz B (1949) The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid.
J Physiol 108: 37-77

Hodgkin AL, Keynes RD (1955a) Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo.
J Physiol 128: 28-60

Hodgkin AL, Keynes RD (1955b) The potassium permeability of giant nerve fibre.
J Physiol 128: 61-88

Hodgkin AL, Horowicz P (1959) The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres.
J Physiol 148: 127-160

Horn R, Brodwick MS (1980) Acetylcholine-induced current in perfused rat myoballs.
J Gen Physiol 75: 297-321

Horn R, Patlak J (1980) Single channel currents from excised patches of muscle membrane.
Proc Natl Acad Sci USA 77: 6930-6934

Hume JR, Giles W (1981) Active and passive electrical properties of single bullfrog atrial cells.
J Gen Physiol 78: 19-42

Hume JR, Giles W (1983) Ionic currents in single isolated bullfrog atrial cells.
J Gen Physiol 81: 153-194

Illanes A, Carpentier R, Reuss L (1970) Effects of temperature on membrane potentials of myocardium from toad and guinea-pig.
Am J Physiol 218: 536-541

Irisawa H (1978) Comparative physiology of the cardiac pacemaker mechanism.
Physiol Rev 58: 461-498

Irisawa H, Kokubun S (1983) Modulation by intracellular ATP and cyclic AMP of the slow inward current in isolated single ventricular cells of the guinea-pig.
J Physiol 338: 321-337

Isenberg G (1977a) Cardiac Purkinje fibres. Resting, action and pacemaker potential under the influence of Ca^{2+}_i as modified by intracellular injection techniques.
Pflügers Arch 371: 51-59

Isenberg G (1977b) Cardiac Purkinje fibres. The slow inward current component under the influence of modified Ca^{2+}_i.
Pflügers Arch 371: 61-69

Isenberg G (1977c) Cardiac Purkinje fibres. Ca^{2+}_i controls steady state potassium conductance.
Pflügers Arch 371: 71-76

Isenberg G (1977d) Cardiac Purkinje fibres. Ca^{2+}_i controls the potassium permeability via the conductance components g_{K1} and g_{K2}.
Pflügers Arch 371: 77-85

Isenberg G, Klöckner U (1980) Glycocalyx is not required for slow inward calcium current in isolated rat heart myocytes.
Nature 284: 358-360

Isenberg G, Klöckner U (1982a) Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB Medium".
Pflügers Arch 395: 6-18

Isenberg G, Klöckner U (1982b) Isolated bovine ventricular myocytes. Characterization of the action potential.
Pflügers Arch 395: 19-29

Isenberg G, Klöckner U (1982c) Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude.
Pflügers Arch 395: 30-41

Isenberg G, Vereecke J, van der Heyden, Carmeliet E (1983) The shortening of the action potential by DNP in guinea-pig ventricular myocytes is mediated by an increase of a time-independent K conductance.
Pflügers Arch 397: 251-259

Junge D (1976) Nerve and muscle excitation.
Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, p 1-143

Kass RS, Tsien RW (1976) Control of action potential duration by calcium ions in cardiac Purkinje fibres.
J Gen Physiol 67: 599-617

Katz B (1949) Les constantes electriques de la membrane du muscle.
Arch Sci Physiol 3: 285-299

Katz B, Miledi R (1970) Membrane noise produced by acetylcholine.
Nature 226: 962-963

Kokubun S, Nishimura M, Noma A, Irisawa H (1982) Membrane currents in the rabbit atrioventricular node cell.
Pflügers Arch 393: 15-22

Kostyuk PG (1981) Calcium channels in the neuronal membrane.
Biochem Biophys Acta 650: 128-150

Latorre R, Miller C (1983) Conduction and selectivity in potassium channels.
J Membrane Biol 71: 11-30

Lee CO (1981) Ionic activities in cardiac muscle cells and application of ion-selective micro-electrodes.
Am J Physiol 241: H459-H478

Lee KS, Akaike N, Brown AM (1980) The suction pipette method for internal perfusion and voltage-clamp of small excitable cells.
J Neurosci Meth 2: 51-78

Leech CA, Stanfield PR (1981) Inward rectification in frog skeletal muscle fibres and its dependence on membrane potential and external potassium.
J Physiol 319: 295-309

Lehmkuhl D, Sperelakis N (1963) Transmembrane potentials of trypsin-dispersed chick heart cells cultured in vitro.
Am J Physiol 205: 1213-1220

Ling G, Gerard RW (1949) The normal membrane potential of frog sartorius fibres.
J Cellular Comp Physiol 34: 383-396

Lux HD, Nagy K (1981) Single channel Ca^{2+} currents in Helix pomatia neurons.
Pflügers Arch 391: 252-254

Lux HD, Neher E, Marty A (1981) Single channel activity associated with the calcium dependent outward current in Helix pomatia.
Pflügers Arch 389: 293-295

Marty A (1981) Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes.
Nature 291: 497-500

McAllister RE, Noble D (1966) The time and voltage dependence of the slow outward current in cardiac Purkinje fibres.
J Physiol 186: 632-662

McDonald TF, Trautwein W (1978) The potassium current underlying delayed rectification in cat ventricular muscle.
J Physiol 274: 217-246

McNutt NS, Fawcett DW (1969) The ultrastructure of the cat myocardium II Artrial Muscle.
J Cell Biol 42: 46-67

Methfessel C, Boheim G (1982) The gating of single calcium-dependent potassium channels is described by an activation/blockade mechanism.
Biophys Struct Mech 9: 35-60

Momose Y, Szabo G, Giles W (1983) An inwardly rectifying K^+ current in bullfrog atrial cells.
Biophys J 41: 311 a

Moore JW, Narahashi T and Shaw TI (1967) An upper limit to the number of sodium channels in nerve membrane?
J Physiol 188: 99-105

Muir AR (1967) The effects of divalent cations on the ultrastructure of the perfused rat heart.
J Anat 101: 239-261

Nag AC, Fishman DA, Aumont MC, Zak R (1977) Studies of isolated adult rat heart cells. The surface morphology and the influence of extracellular calcium ion concentration on cellular viability.
Tissue & Cell 9: 419-436

Neher E, Sakmann B (1976) Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres.
Nature 260: 799-802

Neher E, Sakmann B, Steinbach JH (1978) The extracellular patch-clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes.
Pflügers Arch 375: 219-228

Neher E, Steinbach JH (1978) Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels.
J Physiol 277: 153-176

Nelson PG, Frank K (1967) Anomalous rectification in cat spinal motoneurons and effects of polarizing currents on excitatory postsynaptic potentials.
J Neurophysiol 30: 1097-1113

Noble D (1975) The initiation of the heartbeat.
Oxford: Clarendon

Noble SJ (1976) Potassium accumulation and depletion in frog atrial muscle.
J Physiol 258: 579-613

Noble D, Tsien RW (1968) The kinetics and rectifier properties of the slow potassium current in cardiac Purkinje fibres.
J Physiol 195: 185-214

Noble D, Tsien RW (1969) Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibres.
J Physiol 200: 205-231

Noma A, Irisawa H (1975) Effects of Na^+ and K^+ on the resting membrane potential of the rabbit sinoatrial node cell. Jap J Physiol 25: 287-302

Noma A, Irisawa H (1976) A time- and voltage-dependent potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. Pflügers Arch 366: 251-258

Noma A, Peper K, Trautwein W (1979a) Acetylcholine-induced potassium current fluctuations in the rabbit S-A node cell. Pflügers Arch 381: 255-262

Noma A, Osterrieder W, Trautwein W (1979b) The effect of external potassium on the elementary conductance of the ACh-induced potassium channel in the sino-atrial node. Pflügers Arch 381: 263-269

Noma A, Trautwein W (1978) Relaxation of the ACh-induced potassium current in the rabbit sino-atrial node cell. Pflügers Arch 377: 193-200

Ohmori H, Yoshida S, Hagiwara S (1981) Single K^+ channel currents of anomalous rectification in cultured rat myotubes. Proc Natl Acad Sci USA 78: 4960-4964

Ojeda C, Rougier O, Tourneur Y (1981) Effects of Cs on acetylcholine induced current. Is I_{K1} increased by acetylcholine in frog atrium? Pflügers Arch 391: 57-59

Osterrieder W, Noma A, Trautwein W (1980) On the kinetics of the potassium channel activated by acetylcholine in the s-a node of the rabbit heart. Pflügers Arch 386: 101-109

Osterrieder W, Yang QF, Trautwein W (1981) The time course of the muscarinic response to ionophoretic acetylcholine application to the S-A node of the rabbit heart. Pflügers Arch 389: 283-291

Osterrieder W, Brum G, Hescheler J, Trautwein W, Flockerzi V, Hofmann F (1982a) Injection of subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase into cardiac myocytes modulates Ca^{2+} current.
Nature 298: 576-578

Osterrieder W, Yang QF, Trautwein W (1982b) Effects of barium on the membrane currents in the rabbit S-A node.
Pflügers Arch 394: 78-84

Pallotta BS, Magleby KL, Barrett JN (1981) Single channel recordings of Ca^{2+} activated K^{+} currents in rat muscle cell culture.
Nature 293: 471-474

Patlak J, Horn R (1982) Effect of N-bromoacetamide on single sodium channel currents in excised membrane patches.
J Gen Physiol 79: 333-351

Paul J (1975) Cell and tissue culture (Fifth Edition).
Churchill Livingstone Edinburgh London and New York

Pelzer D, Ochi R (1983) Single calcium channels in heart-kinetic properties of elementary currents.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 322: R 64

Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hütter FJ, Spieckermann PG (1982) Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes.
J Mol Cell Cardiol 14: 397-412

Pott L (1979) On the time course of the acetylcholine-induced hyperpolarization in quiescent guinea-pig atria.
Pflügers Arch 380: 71-77

Pott L, Pusch H (1979) A kinetic model for the muscarinic action of acetylcholine.
Pflügers Arch 383: 75-77

Powell T, Terrar DA, Twist VW (1980) Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium
J Physiol 302: 131-153

Powell T, Twist VW (1976) A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and a tolerance of calcium.
Biochem Biophys Res Com 72: 327-333

Radivoj VK (1978) Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Reid JA, Hecht HH (1967) Barium-induced automaticity in right ventricular muscle in the dog.
Circ Res 21: 849-856

Reuter H (1983) Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs.
Nature 301: 569-574

Reuter H, Stevens CF, Tsien RW, Yellen G (1982) Properties of single calcium channels in cardiac cell culture.
Nature 297: 501-504

Rougier O, Vassort G, Stampfli R (1968) Voltage clamp experiments on frog atrial heart muscle fibres with the sucrose gap technique.
Pflügers Arch 301: 91-108

Russo MA, Cittadini A, Dani AM, Inesi G, Terranova T (1981) An ultrastructural study of calcium induced degenerative change in dissociated heart cells.
J Mol Cell Cardiol 13: 265-279

Sachs F, Lecar H (1977) Acetylcholine-induced current fluctuations in tissue-cultured muscle cells under voltage clamp.
Biophys J 17: 129-143

Sakmann B, Noma A, Trautwein W (1983) Acetylcholine activation of single muscarinic K^+ channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart.
Nature 303: 250-253

Schwarzfeld TA, Jakobson SL (1981) Isolation and development in cell culture of myocardial cells of the adult rat.
J Mol Cell Cardiol 13: 563-575

Seyama I (1976) Characteristics of the rectifying properties of the sino-atrial node cell of the rabbit.
J Physiol 255: 379-397

Sheu S-S, Korth M, Lathrop DA, Fozzard HA (1980) Intra- and extracellular K^+ and Na^+ activities and resting membrane potential in sheep cardiac Purkinje strands.
Circ Res 47: 692-700

Sigworth FJ, Neher E (1980) Single Na^+ channel currents observed in cultured rat muscle cells.
Nature 287: 447-449

Sperelakis N (1979) Origin of the cardiac resting potential
In: Berne RM, Sperelakis N, Geiger S (eds) Handbook of Physiology. The Cardiovascular System I: The Heart.
American Physiological Society, Bethesda, Maryland,
p 187-267

Standen NB, Stanfield PR (1978) A potential- and time-dependent blockade of inward rectification in frog skeletal muscle fibres by barium and strontium ions.
J Physiol 280: 169-191

Taniguchi J, Kokubun S, Noma A, Irisawa H (1981) Spontaneously active cells isolated from sino-atrial and atrio-ventricular nodes of the rabbit heart.
Jpn J Physiol 31: 547-558

Thomas RC (1978) Ion-sensitive intracellular microelectrodes.
Treherne JE and Rubery PH (eds).
Academic Press London, New York, San Francisco

Trautwein W, Dudel J (1958) Zum Mechanismus der Membranwirkung des Acetylcholin an der Herzmuskelfaser.
Pflügers Arch 266: 324-334

Trautwein W, Gottstein U, Dudel J (1954) Der Aktionsstrom der Myokardfaser im Sauerstoffmangel.
Pflügers ARch 260: 40-60

Trautwein W, Sakmann B, Noma A (1982) Single K channels activated by acetylcholine (ACh) in isolated AV nodal cells.
Pflügers Arch 394 (Suppl): R 10

Trube G, Hescheler J (1983) Potassium channels in isolated patches of cardiac cell membrane.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 322: R 64

Trube G, Sakmann B, Trautwein W (1981) Inward rectifying potassium currents recorded from isolated heart cells by the patch clamp method.
Pflügers Arch 391 (Suppl): R 7

Undrovinas AI, Yushmanova AV, Hering S, Rosenshtraukh LV (1980) Voltage clamp method on single cardiac cells from adult rat heart.
Experientia 36: 572-574

Vahouny GV, Wei R, Starkweather R, Davis C (1970) Preparation of beating heart cells from adult rats.
Science 167: 1616-1618

Vereecke J, Isenberg G, Carmeliet E (1980) K efflux through inward rectifying K channels in voltage clamped Purkinje fibres.
Pflügers Arch 384: 207-217

Vleugels A, Vereecke J, Carmeliet E (1980) Ionic currents during hypoxia in voltage-clamped cat ventricular muscle. Circ Res 47: 501-508

Weidmann S (1951) Effect of current flow on the membrane potential of cardiac muscle. J Physiol 115: 227-236

Weidmann S (1974) Heart: Electrophysiology. Ann Rec Physiol 36: 155-169

Woodhull AM (1973) Ionic blockage of sodium channels in nerve. J Gen Physiol 61: 687-708

Yanagihara K, Irisawa H (1980) Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. Pflügers Arch 385: 11-19

Zimmermann ANA, Hülsmann WC (1966) Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membrane of the isolated rat heart. Nature 211: 646-647

ANHANG ZUM LITERATURVERZEICHNIS

Bechem M, Glitsch HG, Pott L (1982) Isolation of cardiac myocytes from guinea-pig right atria.
Pflügers Arch 392: R 4

Bechem M, Glitsch HG, Pott L (1983) Inward rectifying Ba^{++}-sensitive potassium channels in guinea-pig atrial cardioballs.
Nauyn-Schmiedeberg`s Arch Pharmacol 322: R 26

Bechem M, Pott L, Rennebaum H (1983) Atrial muscle cells from hearts of adult guinea-pigs in culture: a new preparation for cardiac cellular electrophysiology.
Eur J Cell Biol 31: 366-369 (im Druck)

Bechem M, Glitsch HG, Pott L (1983) Properties of an inward rectifying K channel in the membrane of guinea-pig atrial cardioballs.
Pflügers Arch (im Druck)

LEBENSLAUF

Name: Bechem, Martin - 4100 Duisburg 1, Schemkesweg 27

geboren: 07.08.1954 in Wuppertal

Familienstand: seit dem 05.06.1981 verheiratet mit
Inge Bechem geb. Hammel

Schulbildung: 1961 - 1965 Volksschule Wallbrecken in Wuppertal
1965 - 1970 Realschule Remscheid-Lennep
Abschluß: Mittlere Reife
1970 - 1973 Leibniz-Gymnasium Remscheid
Abschluß: Abitur

Wehrdienst: 01.10.1973 - 31.06.1975 bei der Bundeswehr

Studium: seit dem 01.10.1975 im Fach Biologie an der Ruhr-Universität Bochum, Diplomprüfung am 09.09.1980

Promotion: seit dem 01.10.1980 an der Ruhr-Universität Bochum

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353